



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE
PREPARACIONES COMERCIALES Y EXTRACTOS
DE AJO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

ROSAURA AVILA LOMBARDO



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

MEXICO, D. F.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Beatriz Albina Medina Jiménez
Vocal: Prof. José Pedraza Chaverri
Secretario: Prof. María Elena Ibarra Rubio
1er. Suplente: Prof. José Ignacio Páramo Ramírez
2do. Suplente: Prof. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 209 de Bioquímica Clínica, 2º piso, edificio B, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

Este trabajo de investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto No. 40009 M)

Asesor:



Dr. José Pedraza Chaverri

Sustentante:



Rosaura Avila Lombardo

ÍNDICE.

1. Introducción	5
2. Antecedentes	7
2.1 Especies reactivas de oxígeno	7
2.2 Sistemas antioxidantes celulares	9
2.3 El ajo	11
2.4 Efecto del calentamiento sobre las propiedades terapéuticas del ajo	13
2.5 Preparación de ajo en polvo	14
2.6 Resumen de las propiedades antioxidantes de compuestos y extractos de ajo	14
3. Justificación	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
6. Metodología	20
6.1 Materiales y métodos	20
6.1.1 Reactivos	20
6.2 Preparación de los extractos de ajo	21
6.3 Valoración fotométrica de la capacidad antioxidante	22
6.3.1 Capacidad atrapadora de O_2^- por los extractos de ajo a partir de un sistema xantina/xantina oxidasa.	22
6.3.2 Capacidad atrapadora de H_2O_2 por los extractos de ajo a partir del ensayo de FOX.	25
6.3.3 Capacidad atrapadora de $\cdot OH$ por los extractos de ajo a partir de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	28
6.4 Análisis estadístico	32
7. Resultados y discusión	33
7.1 Capacidad atrapadora de los extractos sobre el anión O_2^-	33
7.1.1 Extractos de ajo en polvo	33

7.1.2 Extractos de diente de ajo	35
7.1.3 Extractos de ajo en polvo en formas farmacéuticas	36
7.2 Capacidad atrapadora de los extractos sobre el H ₂ O ₂	38
7.2.1 Extractos de ajo en polvo	38
7.2.2 Extractos de diente de ajo	39
7.2.3 Extractos de ajo en polvo en formas farmacéuticas	40
7.3 Capacidad atrapadora de los extractos sobre el ·OH	42
7.3.1 Extractos de ajo en polvo	42
7.3.2 Extractos de diente de ajo	43
7.3.3 Extractos de ajo en polvo en formas farmacéuticas	44
8. Conclusiones	47
9. Perspectivas	47
10. Referencias	48

RESUMEN

En la preparación de alimentos se utiliza frecuentemente el ajo debido al sabor que le confiere a la comida. Además, el ajo se ha usado por miles de años en la medicina popular. Se piensa que algunas de sus propiedades benéficas pueden deberse a la capacidad que tiene de neutralizar las especies reactivas de oxígeno. El calentamiento del diente de ajo entero inhibe la formación de alicina a partir de alina debido a la inactivación de la enzima alinasa, ya que cuando el diente de ajo se corta sin calentamiento previo, la enzima alinasa transforma a su sustrato alina en alicina. El calentamiento a ebullición de los extractos acuosos de diente de ajo crudo (antes y después de cortarlo) y de ajo en polvo determina la estabilidad de los compuestos antioxidantes presentes.

Se evaluó si el calentamiento a ebullición por 30 minutos de extractos acuosos de diente de ajo (antes y después de cortarlo) y de ajo en polvo modifica su capacidad para atrapar anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$). También se evaluó la actividad antioxidante de ajo en polvo presente en las siguientes preparaciones comerciales: Arkocápsulas, Cirkulin y Ajo deshidratado.

Se utilizó la espectrofotometría visible y ultravioleta para medir la capacidad de los diferentes extractos para neutralizar O_2^- , H_2O_2 y $\cdot OH$. En el sistema de O_2^- se midió la reducción del azul de nitrotetrazolio a 560 nm, en el sistema de H_2O_2 la formación de un complejo de Fe^{3+} -naranja de xilenol a 560 nm, y en el sistema para medir $\cdot OH$, la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico a 532 nm. La capacidad de los extractos para neutralizar cada una de las especies se comparó con estándares: ácido nordihidroguaiarético para O_2^- , piruvato para H_2O_2 y dimetiltiourea para radical $\cdot OH$. Se calculó la IC_{50} para cada uno de los extractos. La IC_{50} representa la concentración de la muestra que se requiriere para inhibir o atrapar el 50% de O_2^- , H_2O_2 y $\cdot OH$ *in vitro*. Entre menor sea el valor de la IC_{50} , mayor es la capacidad del compuesto para atrapar O_2^- , H_2O_2 o $\cdot OH$.

El extracto de ajo en polvo es 23% más efectivo que el ajo en polvo calentado para neutralizar O_2^- . El ácido nordihidroguaiarético es 638, 825, 4,188, 2,275, 1,775 y 1,086

veces más efectivo que los extractos de ajo en polvo, ajo en polvo calentado, de diente de ajo crudo, calentado de diente de ajo crudo, diente de ajo hervido y Arkocápsulas, respectivamente. El calentamiento no afectó la capacidad de los extractos de diente de ajo para neutralizar O_2^- . El extracto de ajo en polvo es 34% más efectivo que el ajo en polvo calentado para neutralizar H_2O_2 ; el piruvato es 2, 3, 1.34, 1.24, 1.21, 4, 2 y 11 veces más efectivo que los extractos de ajo en polvo, ajo en polvo calentado, de diente de ajo crudo, calentado de diente de ajo crudo, diente de ajo hervido, Ajo deshidratado, Arkocápsulas y Cirkulin, respectivamente. Los extractos de ajo en polvo, de diente de ajo y preparaciones comerciales no mostraron IC_{50} para radical $\cdot OH$, excepto el extracto de ajo en polvo de Ajo deshidratado que fue 144 veces menos efectivo que la dimetiltiourea.

El calentamiento de ajo en polvo afecta su capacidad para neutralizar O_2^- y H_2O_2 . Sin embargo, el calentamiento de los extracto de diente de ajo no afecta su capacidad para atrapar O_2^- , H_2O_2 y $\cdot OH$, sugiriendo que sus constituyentes sulfurados, como la alina, le confieren dicha actividad antioxidante. La actividad antioxidante del ajo en polvo presente en cada forma farmacéutica no fue uniforme.

La actividad antioxidante del ajo está presente, aún cuando la alinasa es inhibida al calentar por 30 minutos el diente de ajo (antes de cortar), sugiriendo que los compuestos presentes antes y después de la activación de la alinasa tienen capacidad antioxidante. Los compuestos con actividad antioxidante son estables a la temperatura de ebullición del extracto de diente de ajo y de ajo en polvo por 30 minutos. La actividad antioxidante de las presentaciones comerciales no es uniforme.

1. Introducción

A pesar del extenso conocimiento que se tiene acerca de las propiedades terapéuticas del ajo como anticancerígeno (Song y Milner, 2001), antibiótico natural, hipoglucemiante, cardioprotector (Block, 1996; Brace, 2002), hipolipemiante, antihipertensivo (Banerjee et al., 2002), antitrombótico (Ali, 1995; Bordia et al., 1996), protector en el síndrome nefrótico crónico (Pedraza-Chaverri et al., 2000b), en la lipoperoxidación de mitocondrias del corazón (Awazu y Horie, 1997), en el daño a tejido inducido por quemadura (Sener et al., 2003), como antihipertensivo (Banerjee et al., 2002), e inhibidor de la agregación plaquetaria en conejos (Ali et al., 1999), se siguen estudiando más de sus propiedades. Se piensa que dichas propiedades se deben a la actividad que tiene el ajo para reducir la producción de radical $\cdot\text{OH}$ (Yang et al., 1993; Prasad et al., 1996), inhibir lipoperoxidación (Yin y Chen, 1998), lipohidroperoxidación (Yang et al., 1993), inhibir la producción de anión O_2^- (Siegers et al., 1999) e inhibir la oxidación de las lipoproteínas en suero humano (Gil-Ortiz, 2004), por mencionar algunos. Se ha visto que el ajo en polvo tiene propiedades hipolipemiantes y disminuye el daño renal en el síndrome nefrótico crónico (Pedraza-Chaverri et al., 2000a), es antihipertensivo (Pedraza-Chaverri et al., 1998) e inhibe la formación de O_2^- en granulocitos (Siegers et al., 1999). Se piensa que las propiedades antioxidantes se deben a los compuestos organosulfurados presentes en el ajo. Estos compuestos organosulfurados están presentes en el diente de ajo entero como S-alquil-L-cisteína sulfóxidos y como γ -L-glutamyl-S-alquil-L-cisteínas, cuando el ajo es cortado la estructura celular se pierde y la alinasa, enzima presente en células vasculares, se libera, transformando al principal sulfóxido de cisteína, la alina, en alicina (Lawson, 1998).

Hay reportes que indican que la alicina induce apoptosis e inhibe la proliferación de células cancerígenas (Oommen et al., 2004), reduce la presión arterial, la insulina y los triglicéridos (Elkayam et al., 2001). Hay compuestos que protegen la lipoperoxidación de mitocondrias del corazón como el dialil pentasulfuro (Awazu y Horie, 1997), y otros que tienen efectos antioxidantes y antiglicativos en las LDL como el dialil sulfuro, el dialil disulfuro, la S-alilcisteína, la S-etilcisteína, la S-metilcisteína y la S-propilcisteína (Huang

et al., 2004). El extracto de ajo envejecido preparado colocando los dientes de ajo en una solución de etanol al 20% por 20 meses, aunque tiene menor cantidad de alicina, S-metil γ -glutamil cisteína, S-alil γ -glutamil cisteína y S-trans-1-propenil γ -glutamil cisteína comparado con el polvo de ajo (Block, 1996), inhibe la oxidación de las LDL de células endoteliales (Ide y Lau 2001) y tiene actividad bacteriostática y bactericida contra *Helicobacter pylori* (Cellini et al., 1996). También se ha encontrado que la S-alil cisteína disminuye la progresión aterogénica al inhibir la oxidación de las LDL (Ho et al., 2001; Ide y Lau, 2001). Se han hecho estudios y se ha visto que la alina reduce la producción de radical $\cdot\text{OH}$ (Kourounakis y Rezza, 1991), atrapa H_2O_2 e inhibe la lipoperoxidación (Ide et al., 1996). La metina, otro compuesto presente en el ajo entero atrapa radical $\cdot\text{OH}$ y 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) (Xiao y Parkin, 2002). La alicina compuesto que se forma cuando el ajo es cortado reduce la producción de radical $\cdot\text{OH}$ (Xiao y Parkin, 2002; Prasad et al., 1995), inhibe la lipoperoxidación (Prasad et al., 1995), atrapa $^1\text{O}_2$ y DPPH *in vitro* (Xiao y Parkin, 2002).

Teniendo presente estos estudios, y conociendo que el calentamiento del diente de ajo a ebullición del agua por 15 minutos, inhibe a la alinasa y con ello la formación de los tiosulfatos (Koch y Lawson, 1996), se pretende evaluar si el calentamiento por 30 minutos de extractos de diente de ajo (antes y después de cortar) y de polvo de ajo mantienen su actividad antioxidante. También se determinará la actividad antioxidante de extractos de polvo de ajo presente en tres diferentes presentaciones comerciales: Ajo deshidratado, Arkocápsulas y Cirkulin. Por ello, este trabajo nos lleva a los siguientes cuestionamientos: ¿la actividad antioxidante de los extractos de diente de ajo y ajo en polvo dependerá de la actividad de la alinasa? y ¿el calentamiento afectará la actividad de los compuestos antioxidantes presentes en el diente y ajo en polvo? Se tratará de responder a dichas interrogantes en el desarrollo de este trabajo.

2. Antecedentes

2.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

En el organismo se producen ERO, las cuales se han visto involucradas en diferentes padecimientos tales como la diabetes (Maritim et al., 2003) daño renal (Maldonado et al., 2003a; Pedraza-Chaverri et al., 2000a), trombosis (Ali, 1995), daño a tejido inducido por quemadura (Sener et al., 2003), hipertensión (Reckelhoff y Romero, 2003; Leiva et al., 2000), hiperglicemia (Maritim et al., 2003), enfermedades cardiovasculares (Masnatta et al., 2003) y el envejecimiento (Fukagawa, 1999), debido a la reactividad que presentan con biomoléculas.

La formación de ERO tiene su origen en la reducción incompleta del oxígeno a agua como se muestra en la figura I

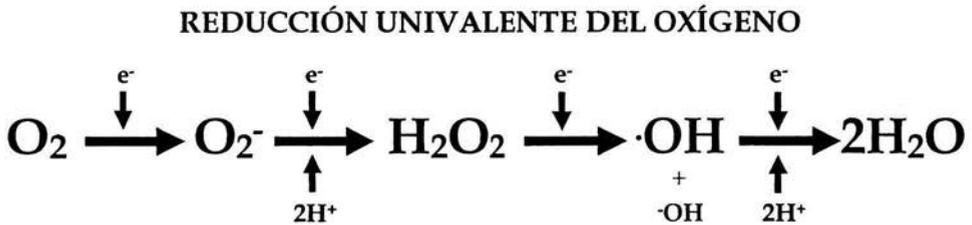


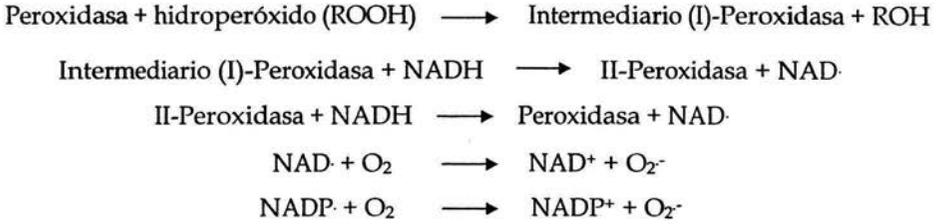
Figura I. Formación de ERO

La presencia de estas ERO es más evidente en las células de algunos tejidos cuando están bajo condiciones desfavorables (Ueda et al., 2001).

La prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGH sintasa) responsable del metabolismo del ácido araquidónico a PGG₂ y posteriormente hidroxidación de esta última a PGH₂, como las peroxidasas, son capaces de oxidar un gran número de cofactores. Esta oxidación sigue una cadena de reacciones que involucran la formación de radicales libres.

La generación de anión superóxido (O₂⁻) durante la acción de la PGH sintasa, lipoxigenasa así como de las peroxidasas depende de un intermediario de estas enzimas

con NADH o NADPH para producir el radical NAD· y NADP·, respectivamente, como se muestra en las siguientes reacciones:



El mecanismo de generación de $\text{O}_2\cdot^-$ por la PGH sintasa y la lipoxigenasa en presencia de NADH y NADPH es análogo al reportado con las peroxidasa (Kukreja et al., 1986).

La ubisemiquinona es la donadora directa de electrones al O_2 responsable de la generación de $\text{O}_2\cdot^-$ y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el complejo III de la cadena respiratoria (Turres et al., 1985).

El anión $\text{O}_2\cdot^-$ y el H_2O_2 también son producidos cuando algunas enzimas involucradas en el transporte de electrones son oxidadas en condiciones aerobias. Las enzimas que producen estas especies utilizan flavina como coenzima y generan dichas especies como se muestra en siguiente figura II (Imlay, 2003).

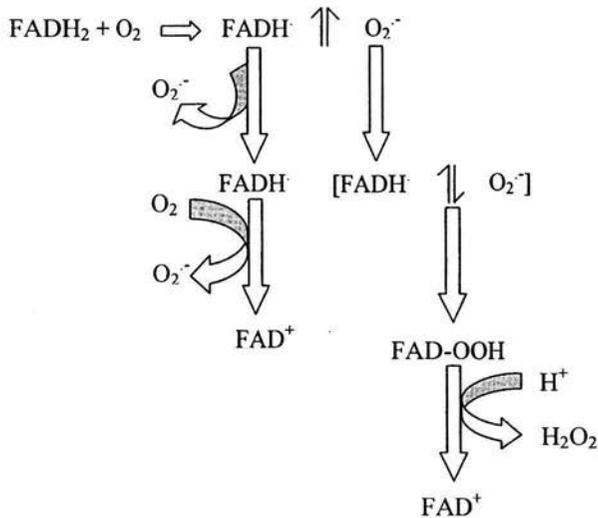
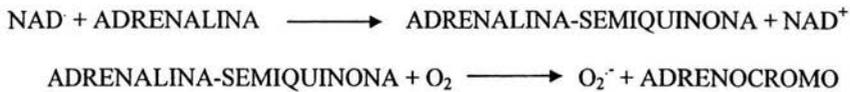
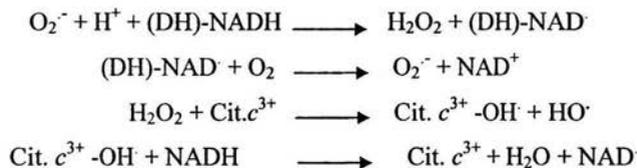


Figura II. Autooxidación de una flavoproteína

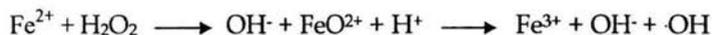
Otra vía para generar O_2^- es la oxidación de las catecolaminas como la adrenalina por el radical $NAD\cdot$ como se muestra a continuación:



La oxidación de las deshidrogenasas otra vía para generar anión O_2^- , H_2O_2 y radical $\cdot OH$, se muestra en las siguientes reacciones: (Turres y Boveris, 1980)



La reacción de Fenton describe otro mecanismo por el cual se genera radical $\cdot OH$ a partir de H_2O_2 y Fe^{2+} .



2.2 Sistemas antioxidantes celulares

En el organismo, las ERO mantienen un equilibrio con sistemas antioxidantes naturales endógenos tanto enzimáticos (tabla 1) como no enzimáticos (vitamina C, vitamina E, bilirrubina, ácido úrico, flavonoides, glutatión, β -carotenos, etc.) (Cohen-Kerem y Koren, 2003). Las ERO tienen un efecto benéfico en el organismo, como ayudar a los leucocitos a destruir bacterias ocasionándoles daño a la estructura celular. Sin embargo, existen condiciones desfavorables en las cuales se rompe este equilibrio de antioxidantes y pro-oxidantes como la dieta baja en antioxidantes, la disminución de antioxidantes endógenos o el aumento de ERO por un estado patológico, etc. Este desequilibrio, llamado estrés oxidativo, causa daños a las proteínas celulares, lípidos de

membrana y ácidos nucleicos, lo que ocasiona en muchos casos, la muerte celular (Maritim et al., 2003; Fukagawa, 1999).

Tabla 1. Sistema antioxidante enzimático (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Superóxido dismutasa	$\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Catalasa	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Glutación peroxidasa	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightleftharpoons \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
Glutación reductasa	$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$
Tiorredoxina reductasa	$\text{Tiorredoxina-S}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NADP}^+ + \text{Tiorredoxina-(SH)}_2$
	$\text{Tiorredoxina-(SH)}_2 + \text{proteína-S}_2 \rightleftharpoons \text{Tiorredoxina-S}_2 + \text{Proteína-(SH)}_2$
Hemo oxigenasa	$\text{Hemo} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+]{\text{Fe}^{2+}} \text{CO} + \text{Biliverdina}$ $\text{Biliverdina} \xrightarrow[\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+]{\text{BR}} \text{Billirrubina}$

La tabla 1 muestra algunos mecanismos enzimáticos que las células poseen para protegerse del daño oxidativo. Entre los mecanismos enzimáticos, la primera línea de defensa es la superóxido dismutasa que dismuta el anión O_2^- a H_2O_2 . El H_2O_2 se metaboliza por la catalasa y por la glutación peroxidasa a H_2O . La glutación peroxidasa reduce el H_2O_2 a H_2O , junto con la oxidación del glutatión. El glutatión es reducido por la glutación reductasa en presencia del NADPH para que pueda ser utilizado por la glutación peroxidasa. La tiorredoxina oxidada se reduce por el NADPH a través de la acción de la tiorredoxina reductasa. Otro mecanismo es la conversión de grupo hemo por la hemo-oxigenasa en presencia de NADPH y O_2 a biliverdina, misma que en presencia de NADPH y por acción de la biliverdina reductasa (BR) se transforma a bilirrubina.

Una forma de prevenir el estrés oxidativo es proporcionar al organismo una dieta de alimentos rica en antioxidantes como las fresas, la cebolla, las espinacas que, limón que contienen vitamina C (Chávez y Ledesma, 1997) y el ajo del cual se han detallado sus propiedades antioxidantes.

2.3 El ajo

El ajo, cuyo nombre científico es *Allium sativum*, está compuesto principalmente por agua (62-68%), fibra (1.5%), proteínas (1.5-2.1%), lípidos (0.1-0.2%), vitaminas (0.015%), minerales (0.7%), saponinas (0.04-0.11%), γ -glutamilfenilalanina (0.04-0.11%), ácidos fenólicos (0.004%), ácido fítico (0.08%), β -sitosterol (0.0015%) y compuestos organosulfurados (1.1-3.5%) (Lawson, 1998). Estos últimos han adquirido importancia debido a que cuando el ajo es cortado, los S-alkil-L-cisteína sulfóxidos presentes en el diente de ajo intacto, a excepción de la cicloalina, sufren una transformación a tiosulfinatos (Tabla 2), debido primero, a la reacción de la alina que se encuentra en células del mesófilo, con la alinasa que se encuentra en células vasculares (Figura III), y segundo, a su inestabilidad. Estos compuestos son principalmente alina, metina e isoalina, y los compuestos que se forman después de la reacción son alquilalcanotiosulfinatos, los cuales confieren al ajo el olor característico; entre ellos están la alicina, alilmetanotiosulfato, ácidos sulfénicos y las γ -L-glutamil-S-alkil-L-cisteínas (Lawson, 1998). Cuando un extracto acuoso de ajo se calienta, la alicina se convierte a dialil disulfuro, dialil trisulfuro y a polisulfuros (Block, 1996). Sin embargo, el calentamiento por 20 minutos volatiliza un 97% de los tiosulfinatos formados. El calentamiento del diente de ajo a ebullición del agua por 15 minutos, inhibe a la alinasa (Koch y Lawson, 1996) y con ello la formación de los tiosulfinatos.

Tabla 2. Principales compuestos organosulfurados en el ajo entero y molido (Lawson, 1998; Koch y Lawson, 1996).

COMPUESTOS	AJO ENTERO mg/g PESO FRESCO	AJO MOLIDO mg/g PESO FRESCO
S-Alquil-L-cisteína sulfóxidos		
Alil cisteína sulfóxido (alina)	6-14	nd
Metil cisteína sulfóxido (metina)	0.5-2	nd
trans-1-propenil cisteína sulfóxido (isoalina)	0.1-1.2	nd
Cicloalina	0.5-1.5	0.5-1.5
γ-L-glutamil-S-alkil-L-cisteínas		
γ-L-glutamil-S-trans-1-1propenil cisteína	3-9	3-9
γ-L-glutamil-S-alil cisteína	2-6	2-6
γ-L-glutamil-S-metil cisteína	0.1-0.4	0.1-0.4
Alquilalcanotiosulfatos		
Alil 2-propentiosulfato (alicina)	nd	2.5-4.5
Alilmetiltiosulfatos (2-isómeros)	nd	0.3-1.5
Alil trans-1-propentiosulfatos (2-isómeros)	nd	0.05-1.0
Metiltrans-1-propentiosulfatos (2-isómeros)	nd	0.02-0.2
Metilmetanotiosulfato	nd	0.05-0.1

nd = no determinado

ajo crudo por 10 minutos, disminuye el efecto de la agregación plaquetaria comparada con el extracto de ajo crudo *in vitro*. El extracto calentado de ajo crudo tuvo poco efecto sobre la actividad de la ciclooxigenasa en plaquetas sanguíneas, vasos sanguíneos y pulmón (Ali et al., 1999), al igual que la actividad bactericida contra *Helicobacter pylori* comparado con el extracto de ajo crudo (Cellini et al., 1996).

2.5 Preparación de ajo en polvo

Una de las formas para preparar ajo en polvo es la liofilización de dientes de ajo previamente congelados con nitrógeno líquido o hielo seco. Otra forma de prepararlo es por deshidratación, cortando el diente de ajo en pequeñas rebanadas y sometiéndolo a temperaturas mayores de 60°C, proceso en el que se pierden muchos tiosulfatos. También se prepara con acetona y se torna menos oloroso que con agua (Block, 1996). Así, dependiendo de cual de estos procesos se lleve a cabo será la cantidad de alina presente en el mismo (Koch y Lawson, 1996).

El polvo de ajo tiene distintas aplicaciones, las principales son: como condimento en la preparación de alimentos y su uso con fines terapéuticos. Se presenta comercialmente en forma de tabletas, grageas y cápsulas. Las grageas con capa entérica previenen la inhibición de la alinasa en el estómago a causa del pH bajo y evitan, al igual que las cápsulas, el olor característico (Block, 1996; Lawson, 1998).

2.6 Resumen de las propiedades antioxidantes de compuestos y extractos de ajo

En la tabla 3 se resumen algunas de las propiedades antioxidantes de algunos compuestos y extractos de ajo. Los compuestos descritos han sido estudiados individualmente, sugiriendo que la actividad antioxidante de los extractos de diente y de polvo de ajo puede deberse a la presencia de estos compuestos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que otros compuestos presentes en dichos extractos como las γ -glutamil -S-alquil-L-cisteínas estén participando en la actividad antioxidante.

Tabla 3. Resumen de los compuestos y extractos de ajo con propiedad antioxidante.

Extractos	Propiedad	Referencia
Extracto de diente de ajo crudo	Reduce la producción de radical OH	Yang et al., 1993; Prasad et al., 1996
	Inhibe la lipoperoxidación	Yin y Cheng, 1998
	Inhibe la lipohidroperoxidación	Yang et al., 1993
	Inhibe la oxidación de las lipoproteínas en suero humano	Pedraza-Chaverri et al., 2004a Gil-Ortiz, 2004.
	Inhibe in vitro la oxidación de las lipoproteínas en suero humano	Albarrán-Morán, 2003 Pedraza-Chaverri et al., 2004a
Extracto calentado de ajo crudo	Reduce la producción de radical OH	Prasad et al., 1996
	Inhibe la lipoperoxidación	Yin y Cheng, 1998
	Inhibe in vitro la oxidación de las lipoproteínas en suero humano	Albarrán-Morán, 2003 Pedraza-Chaverri et al., 2004a
Extracto de ajo hervido	Inhibe la oxidación de las lipoproteínas en suero humano	Gil-Ortiz, 2004. Pedraza-Chaverri et al., 2004a
Extracto de ajo en polvo	Reduce la producción de radical OH	Torok et al., 1994
	Inhibe la producción de O ₂ ⁻	Siegers et al., 1999
	Inhibe in vitro la oxidación de las lipoproteínas en suero humano	Albarrán-Morán, 2003 Pedraza-Chaverri et al., 2004a
Extracto de ajo en polvo calentado	Reduce la producción de radical OH	Kim et al., 2001
	Atrapa H ₂ O ₂	Ide et al., 1996; Ide y Lau, 1999
Extracto de ajo sin pelar, calentado en microondas	Inhibe la oxidación de las lipoproteínas en suero humano	Gil-Ortiz, 2004 Pedraza-Chaverri et al., 2004a
Extracto de diente de ajo en escabeche	Inhibe la oxidación de las lipoproteínas en suero humano	Gil-Ortiz, 2004. Pedraza-Chaverri et al., 2004a
Extracto de ajo envejecido	Inhibe la lipoperoxidación	Ide et al., 1997; Yamasaki et al., 1994; Wang et al., 1998; Ide et al., 1996; Ide y Lau, 1999; Imai et al., 1994; Yang et al., 1993
	Previene la depleción del glutatión en células endoteliales	Ide y Lau, 1999
	Disminuye la insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina	Maldonado-Jiménez, 2004 Maldonado et al., 2003a

	Aumenta el contenido de glutatión en células endoteliales	Geng et al., 1997; Wang et al., 1999
	Aumenta la SOD, GPx y catalasa en células endoteliales.	Geng et al., 1997; Wang et al., 1999
Aceite de ajo	Inhibe la lipoperoxidación	Hikino et al., 1986
Alina	Reduce la producción de radical OH	Kourounakis y Rekká, 1991
	Atrapa H ₂ O ₂	Ide et al., 1996
	Inhibe la lipoperoxidación	Ide et al., 1996
Alicina	Reduce la producción de radical OH	Prasad et al., 1995; Xiao y Parkin, 2002
	Inhibe la lipoperoxidación	Prasad et al., 1995
	Atrapa singulete (¹ O ₂) <i>in vitro</i>	Xiao y Parkin, 2002
	Atrapa DPPH <i>in vitro</i>	Xiao y Parkin, 2002
Isoalina	Atrapa radical OH <i>in vitro</i>	Xiao y Parkin, 2002
	Atrapa singulete (¹ O ₂) <i>in vitro</i>	Xiao y Parkin, 2002
	Atrapa DPPH <i>in vitro</i>	Xiao y Parkin, 2002
Metina	Atrapa radical OH <i>in vitro</i>	Xiao y Parkin, 2002
	Atrapa DPPH <i>in vitro</i>	Xiao y Parkin, 2002
S-alil cisteína	Reduce la producción de radical OH	Kim et al., 2001
	Inhibe la producción de O ₂ ⁻	Kim et al., 2001
	Atrapa H ₂ O ₂	Ide et al., 1996; Ho et al., 2001
	Disminuye la insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina	Maldonado-Jiménez, 2004 Maldonado et al., 2003b
	Inhibe la lipoperoxidación	Ide et al., 1997; Yamasaki et al., 1994; Ide et al., 1996; Imai et al., 1994
Na(-1-desoxi-D-fructos-1-il)-L-arginina	Atrapa H ₂ O ₂	Ryu et al., 2001
S-alilmercaptocisteína	Atrapa H ₂ O ₂	Ide et al., 1996
	Inhibe la lipoperoxidación	Ide et al., 1996; Imai et al., 1994; Hikino et al., 1986
	Previene parcialmente el daño renal funcional y estructural inducido por gentamicina.	Chirino-López, 2003 Pedraza-Chaverri et al., 2004b
	Tiene efecto protector en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina	Castro-Cardelas, 2003 Pedraza-Chaverri et al., 2004b
Dialil sulfuro	Disminuye de forma parcial la nefrotoxicidad inducida por gentamicina.	Cerón-Toalá, 2002 Pedraza-Chaverri et al., 2003a
Dialil disulfuro	Inhibe la lipoperoxidación	Dwivedi et al., 1998; Fanelli et al., 1998

	Disminuye el daño renal inducido por gentamicina	González-Orozco, 2003 Pedraza-Chaverri et al., 2003b
	Inhíbe la lipohidroperoxidación	Yang et al., 1993
Dialil trisulfuro	Atrapa O ₂ ⁻ <i>in vitro</i>	Pérez-García, 2002
Dialil polisulfuros: tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta sulfuro.	Inhíbe la lipoperoxidación	Horie et al., 1992;
Propil disulfuro	Inhíbe la lipohidroperoxidación	Yang et al., 1993
Alil sulfuro	Inhíbe la lipohidroperoxidación	Yang et al., 1993

3. JUSTIFICACIÓN

La capacidad del ajo para inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas en suero humano (Albarrán-Morán, 2003; Pedraza-Chaverri et al., 2004a), disminuir la insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina (Maldonado-Jiménez, 2004; Pedraza-Chaverri et al. 2000a), inhibir la lipoperoxidación (Prasad et al., 1995) y la lipohidroperoxidación (Yang et al., 1993) se piensa que se debe a sus propiedades antioxidantes. Estas propiedades del ajo y de sus constituyentes organosulfurados se han demostrado *in vitro* por algunos investigadores. Xiao y Parkin en el 2002 demostraron que la alicina, isoalina y la metina atrapan DPPH, la metina y la isoalina atrapan radical $\cdot\text{OH}$, la alicina y la isoalina atrapan singulete ($^1\text{O}_2$). Ide et al. (1996) demostraron que la alina atrapa H_2O_2 e inhibe lipoperoxidación. Pedraza-Chaverri et al., (2004b) demostraron que la S-alilmercaptocisteína previene parcialmente el daño renal funcional y estructural inducido por gentamicina. Cerón-Toalá (2002) demostró que el dialil sulfuro disminuye en forma parcial la nefrotoxicidad inducida por gentamicina. Pérez-García (2002) determinó la capacidad del dialil trisulfuro para atrapar *in vitro* anión O_2^- .

Con esta investigación se pretende saber si el ajo es capaz de mantener sus propiedades antioxidantes cuando es sometido a 30 minutos de calentamiento. Con ello, se podrá saber si la capacidad antioxidante del ajo se debe a la actividad de la alinasa, es decir, a los tiosulfatos que se forman por la acción de la alinasa sobre la alina o a los sulfóxidos de cisteína presentes en el diente de ajo entero. De esta manera, se determinará también si los compuestos con actividad antioxidante presentes en el diente y ajo en polvo son estables a la temperatura de ebullición por 30 minutos de los extractos respectivos. Se determinará la actividad antioxidante del ajo en polvo presente en preparaciones comerciales para confirmar que la actividad no será uniforme debido al proceso al que es sometido el diente de ajo para su elaboración.

4. HIPÓTESIS

La capacidad para atrapar O_2^- , H_2O_2 y radical $\cdot OH$ de los extractos de ajo en polvo y diente de ajo (antes y después de cortar) sometidos a 30 minutos de calentamiento se verá disminuida.

La capacidad para atrapar O_2^- , H_2O_2 y radical $\cdot OH$ de los extractos de ajo en polvo presente en las preparaciones comerciales no será uniforme.

5. OBJETIVOS

- Determinar si el calentamiento a ebullición por 30 minutos de extractos acuosos de diente de ajo (antes y después de cortarlo) y de ajo en polvo afecta la capacidad y la estabilidad de los compuestos activos para atrapar O_2^- , H_2O_2 y radical $\cdot OH$.
- Determinar la capacidad antioxidante presente de los diferentes extractos de ajo en polvo para atrapar O_2^- , H_2O_2 y $\cdot OH$.

6. METODOLOGÍA

6.1 *Materiales y reactivos*

6.1.1 Reactivos

El ajo en polvo se adquirió de McCormick® (México D.F.) y el diente de ajo fresco se adquirió de una tienda de autoservicio (México D.F.). Las preparaciones comerciales estudiadas fueron: una caja con 50 cápsulas de 400 mg de ajo en polvo marca Ajo deshidratado hecho en México por el Laboratorio de productos naturales Azteca, S.A de C.V. con # de lote 180402214, una caja con 180 grageas de 66 mg de ajo en polvo marca Cirkulin hecho en Alemania por Roha Arzneimittel GmbH y distribuido en México por Farmasa Schwabe con # de lote 120117 y una caja con 50 cápsulas de 330 mg de ajo en polvo marca Arkocápsulas hecho en Francia por laboratorio Arkopharma S.A. con # de lote N32756.

La xantina oxidasa, la xantina, el ácido ascórbico, el ácido tiobarbitúrico (TBA), la deferoxamina (DFO), la dimetiltiourea (DMTU), el piruvato, el tetrametoxipropano, la desoxirribosa, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el naranja de xilenol y el hidroxitolueno butilado se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

El ácido tricloroacético (TCA), el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), el carbonato de sodio (Na_2CO_3), las sales de fosfato para los amortiguadores, el sulfato ferroso amoniacal, el ácido sulfúrico (H_2SO_2) y el ácido clorhídrico (HCl) se adquirieron de J.T. Baker (México, D.F.).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el metanol grado HPLC se adquirieron de Mallinckrodt (México D.F.) y el cloruro férrico se adquirió de Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos los compuestos son calidad de grado analítico.

6.2 Preparación de los extractos de ajo

Extracto de diente de ajo crudo (EDAC)

Asumiendo que el diente de ajo tiene aproximadamente 70% de agua y 30% de compuestos sólidos, se pesó el diente de ajo para calcular la cantidad de agua y la cantidad de compuestos presentes en él, se hicieron los cálculos pertinentes para obtener una concentración de 0.1 g de compuestos sólidos por 1 mL de agua. Se homogenizó con agua destilada utilizando un politrón, se centrifugó en un equipo Beckman, modelo J2-21 a 15,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se utilizó el sobrenadante. A partir de esta disolución se hicieron diluciones que se usaron en los tres sistemas: xantina/xantina oxidasa, ensayo de FOX y el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, que se detallarán más adelante.

Extracto calentado de diente de ajo crudo (ECDAC)

El proceso para la preparación del extracto fue el mismo que para el EDAC, a excepción de que el extracto se calentó por 30 minutos a ebullición antes de centrifugar.

Extracto de diente de ajo hervido (EDAH)

Para preparar el extracto, en un vaso de precipitado se calentó agua hasta ebullición, se agregó el diente de ajo sin cortar y se dejó ahí por 30 minutos. Después, se siguió el mismo procedimiento que para el EDAC.

Extracto de ajo en polvo (EAP)

Se pesaron 0.3 g de ajo en polvo y se adicionaron 3 mL de agua, se agitó durante 10 minutos y se centrifugó a 15,000 rpm por 10 minutos a 4°C; se utilizó el sobrenadante y a partir de esta concentración se hicieron diluciones.

Extracto calentado de ajo en polvo (ECAP)

El procedimiento fue el mismo que para el EAP, excepto que el extracto se calentó por 30 minutos a ebullición antes de centrifugar.

Extracto de ajo en polvo; preparación comercial: Ajo deshidratado (AD)

Para preparar el extracto, se pesó el contenido de 10 cápsulas de ajo deshidratado por separado, se obtuvo el promedio y a partir de éste se calculó la cantidad de ajo de acuerdo a la especificación de la presentación para obtener una concentración de 0.1g/mL. El procedimiento fue el mismo que para el EAP.

Extracto de ajo en polvo; preparación comercial: Cirkulin (CK)

Primero se pesaron 10 grageas de la preparación comercial Cirkulin por separado, se obtuvo el promedio y a partir de éste se calculó la cantidad necesaria de acuerdo a la especificación de la presentación para obtener una concentración de 0.1 g/mL. El procedimiento fue el mismo que para el EAP.

Extracto de polvo de ajo; preparación comercial: Arkocápsulas (AK)

El procedimiento corresponde al utilizado en AD.

6.3 Valoración fotométrica de la capacidad antioxidante

6.3.1 Capacidad atrapadora de O_2 por los extractos de ajo a partir de un sistema xantina/xantina oxidasa

Se usó un programa de longitud de onda fija, en donde se registraron las lecturas cada minuto por tres minutos a 560 y 295 nm.

El fundamento del ensayo en la figura IV:

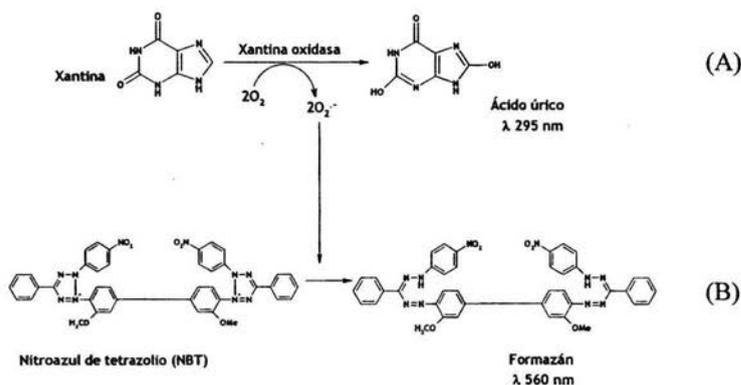


Figura IV. (A) Generación del $O_2^{\cdot -}$ y ácido úrico a partir del sistema xantina/xantina oxidasa. (B) Reducción del NBT por el $O_2^{\cdot -}$.

El $O_2^{\cdot -}$ generado por la xantina oxidasa reduce al azul de nitrotetrazolio, el cual se transforma a formazán que presenta absorbencia a 560 nm. Si los extractos de diente de ajo y polvo de ajo como el ácido nordihidroguaiarético tienen actividad antioxidante sobre el $O_2^{\cdot -}$, el NBT no será reducido. Sin embargo, si se observa actividad antioxidante puede deberse a que el compuesto está actuando directamente con el $O_2^{\cdot -}$ o que está inhibiendo a la xantina oxidasa que cataliza la formación del $O_2^{\cdot -}$. La constante producción de ácido úrico que absorbe a 295 nm indicará que el extracto o compuesto no está inhibiendo a la xantina oxidasa, permitiendo la generación de $O_2^{\cdot -}$ y la subsiguiente reducción del NBT.

El ácido nordihidroguaiarético (NDGA) fue utilizado como estándar (figura V), después de haber mostrado en un trabajo que se hizo en nuestro laboratorio, capacidad para atrapar $O_2^{\cdot -}$ a concentraciones de 0.00009 a 0.015 mg/mL a partir de sistema xantina/xantina oxidasa.

El NDGA es un potente antioxidante (Kanehira et al., 2003) caracterizado como un lignano encontrado en la planta *Larrea tridentata* que es un arbusto que crece en el suroeste de EUA y en el norte de México. Esta planta que se conoce comúnmente como

chaparral, arbusto de crosota o gobernadora, ha sido usada etnobotánicamente para tratar diferentes enfermedades (revisado en Lambert et al., 2002).

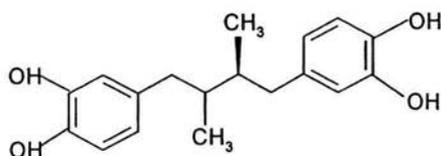


Figura V. Estructura química del NDGA.

Ensayo:

	*100%	Muestra
Sustrato**	750 μ L	750 μ L
Muestra***	-----	100 μ L
Amortiguador de fosfatos 50 mM	100 μ L	-----
Xantina oxidasa (168 U/L)	150 μ L	150 μ L

* el 100%, es el punto o valor de referencia para determinar si los extractos tienen o no actividad antioxidante.

** Sustrato:

	[Final]
Xantina	0.09 mM
Carbonato de sodio	0.016 M
NBT	22.8 μ M
Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0	

***Muestra.

A partir del stock 0.1 g/mL de cada extracto se prepararon las siguientes concentraciones:

	(mg/mL)
1	0.12
2	0.32
3	0.76
4	1.53
5	2.61
6	3.13
7	4.11

Xantina oxidasa.

La solución de la enzima se prepara dependiendo del número de muestras y del número del lote. Por ejemplo: el lote número x indica que 1 mg de sólido equivale a 0.06 U:

$$\begin{array}{l} 0.06 \text{ U} \text{ ----- } 1 \text{ mg} \qquad \qquad \qquad 2800 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ 168 \text{ U} \text{ ----- } X = 2800 \text{ mg} \qquad X = 11.2 \text{ mg} \text{ ----- } 4 \text{ mL} \end{array}$$

Por lo que hay que pesar 11.2 mg de la enzima y disolverla en 4 mL de agua destilada.

Una vez obtenidas las absorbencias a 560 y 295 nm a partir de los datos del tubo 100% expresado anteriormente, se calculó el porcentaje de NBT reducido en presencia de la muestra.

6.3.2 Capacidad atrapadora de H₂O₂ por los extractos de ajo a partir del ensayo de FOX

Al ensayo de hierro-naranja de xilenol (FOX) fueron incorporados todos los extractos de diente de ajo, polvo de ajo y de piruvato, para medir la capacidad atrapadora de H₂O₂ durante 30 minutos. El ensayo de FOX consiste en la oxidación del ion ferroso (Fe²⁺) por el H₂O₂ a la forma férrica (Fe³⁺) la cual se une al naranja de xilenol y forma un complejo colorido que absorbe a 560 nm (figura VI).

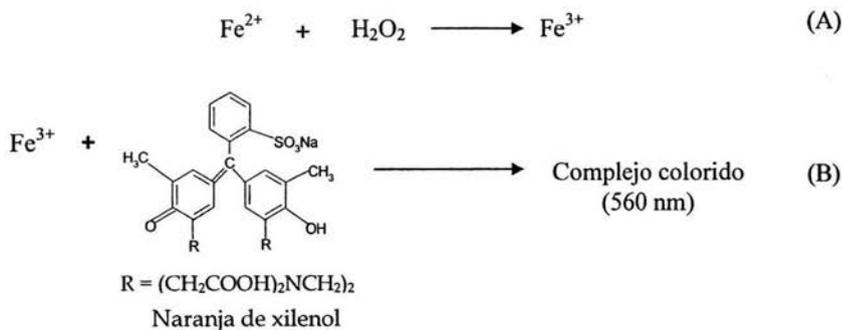


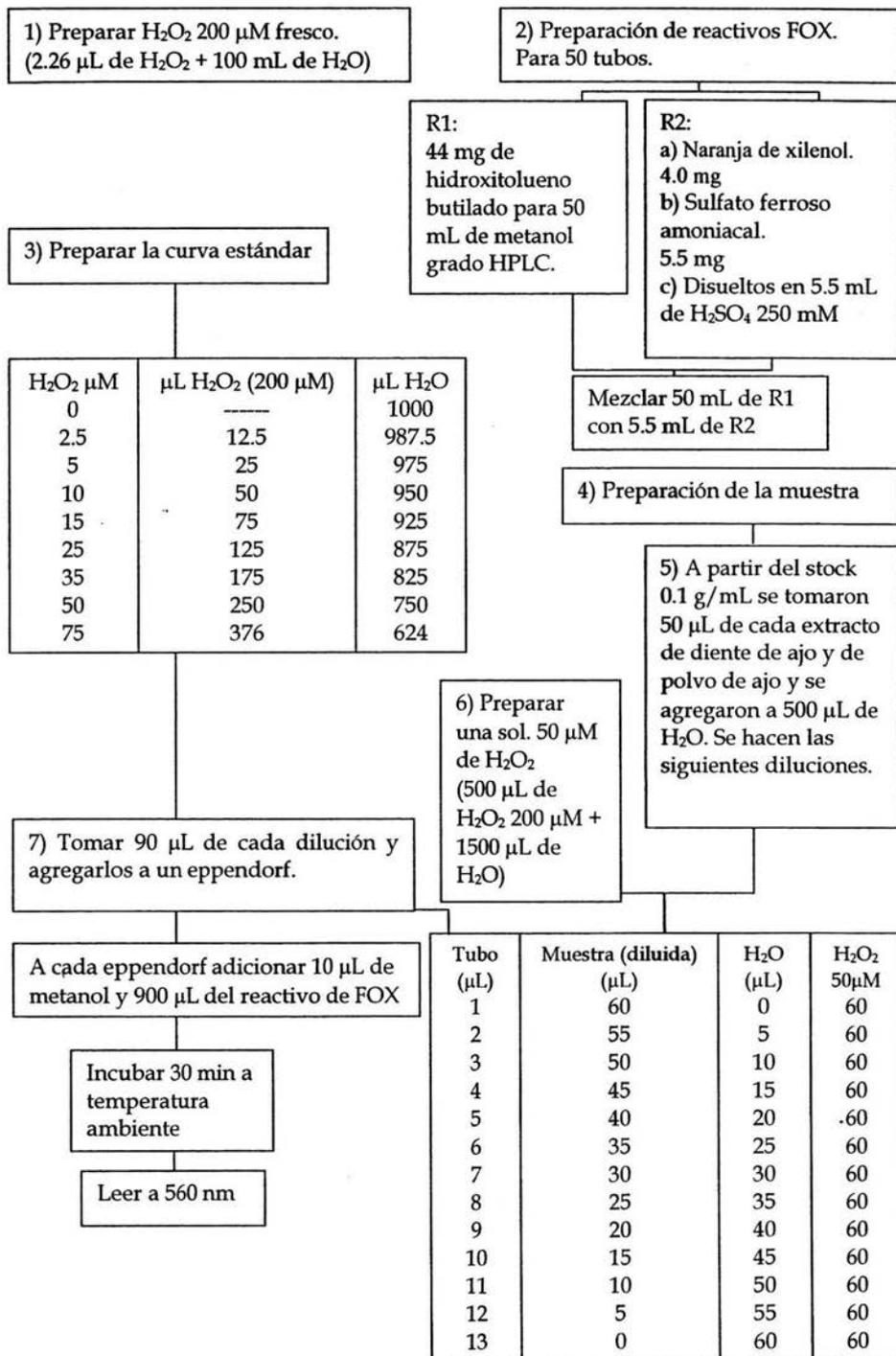
Figura VI. (A) Oxidación del ion ferroso por el H₂O₂. (B) Formación del complejo por el Fe³⁺ y el naranja de xilenol.

El piruvato fue utilizado como estándar ya que se ha reportado que reduce la cantidad de H_2O_2 *in vitro* (Salahudeen et al., 1991) reaccionando como se muestra en la figura VII:



Figura VII. Descarboxilación del piruvato por el H_2O_2 .

Procedimiento.



Concentración del extracto de diente de ajo y de polvo de ajo en el ensayo a partir de la dilución (paso 6) del stock.

Dilución	(mg/mL) en el ensayo
1	0.12
2	0.37
3	0.75
4	1.13
5	1.51
6	1.89
7	2.27
8	2.65
9	3.03
10	3.40
11	3.78
12	4.16
13	4.54

A partir de los datos obtenidos de la curva estándar se determinaron las concentraciones de H₂O₂ en presencia de la muestra, se graficaron los resultados en base la cantidad de peróxido existente después de 30 minutos de incubación, a partir del control.

6.3.3 Capacidad atrapadora de $\cdot\text{OH}$ por los extractos de ajo a partir de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Se usó un sistema generador de $\cdot\text{OH}$ para determinar la capacidad neutralizante de cada muestra para este radical. En este ensayo el radical $\cdot\text{OH}$ generado a partir de la reacción de Fenton, degrada a la desoxirribosa a sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (Figura VIII) y este complejo es medido espectrofotométricamente a 532 nm y cuantificada a partir de una curva de tetrametoxipropano.

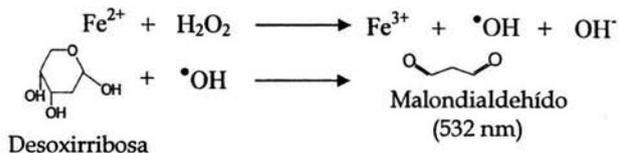


Figura VIII. Degradación de la desoxirribosa por el radical $\cdot\text{OH}$ generado por la reacción de Fenton

La dimetiltiourea (Figura IX) fue elegida como estándar debido a que ha mostrado ser una potente atrapadora de radical $\cdot\text{OH}$ (Walter y Shah, 1988).

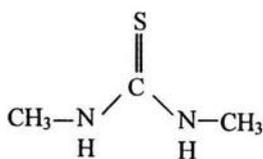
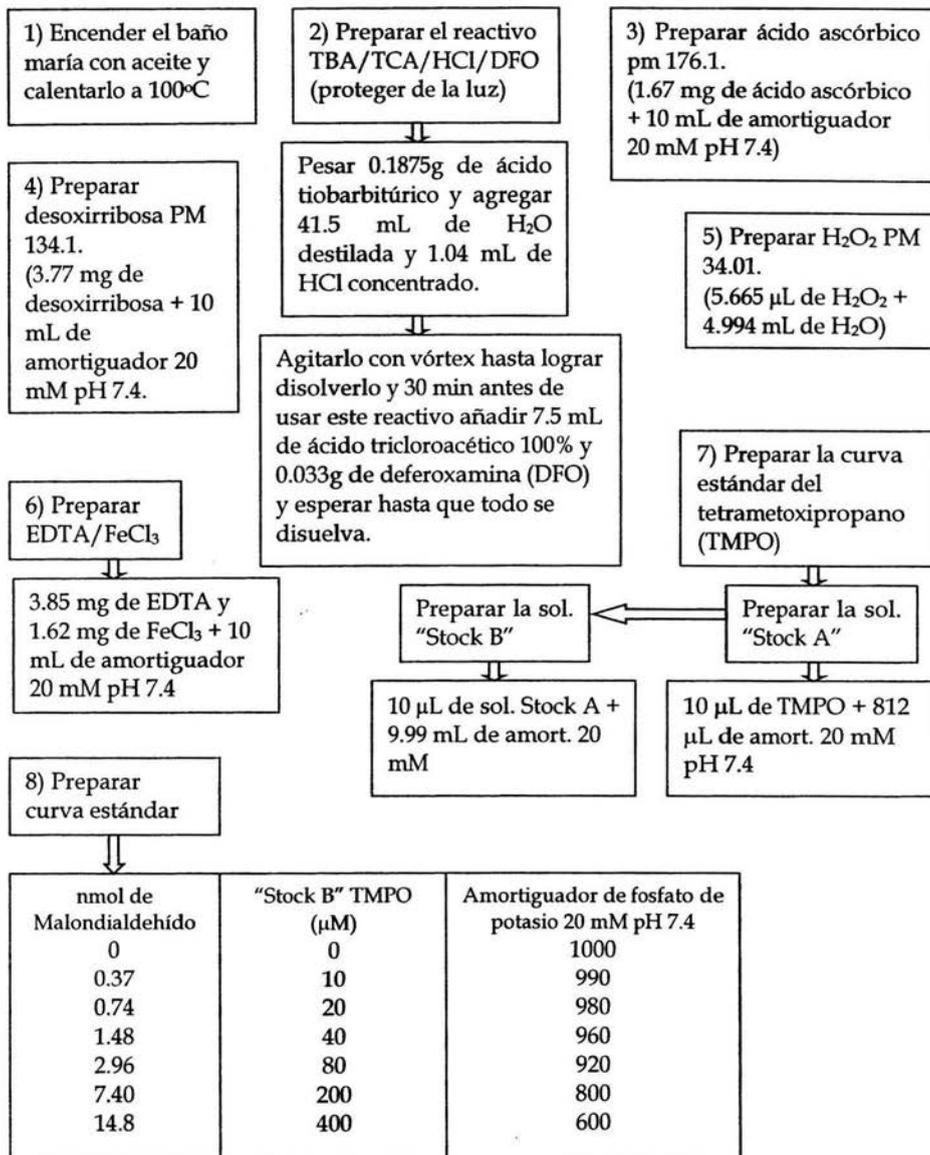
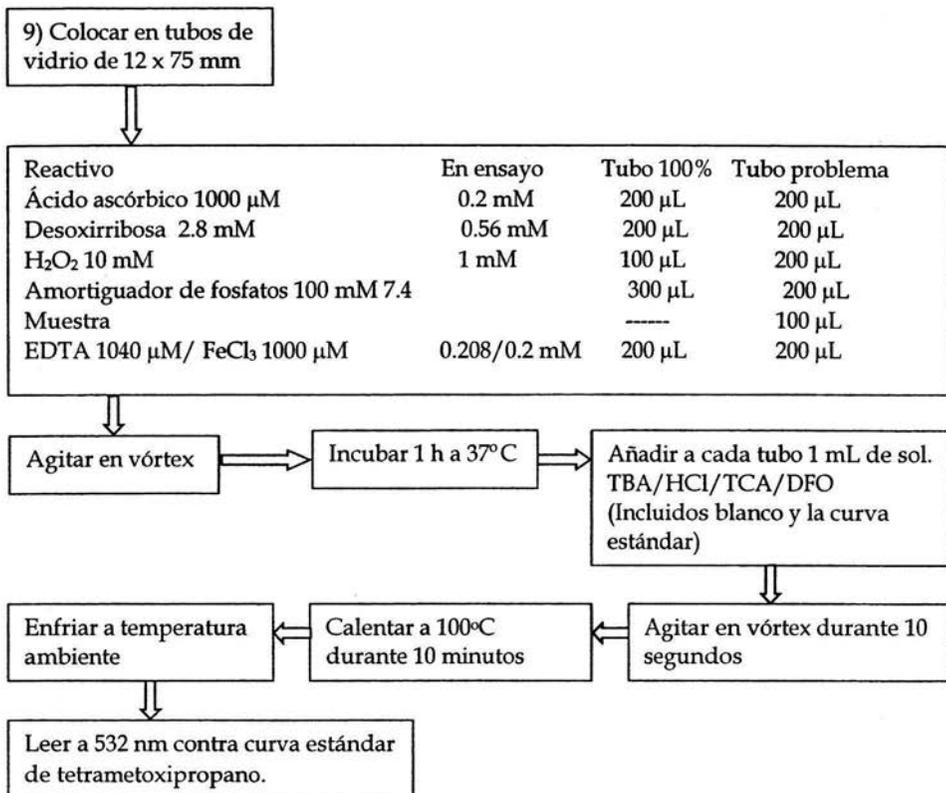


Figura IX. Dimetiltiourea

Procedimiento.





A partir de las absorbencias del tubo sin muestra (tubo 100%) se calculó el porcentaje de complejo del ácido tiobarbitúrico en presencia del extracto para luego realizar el análisis correspondiente.

6.4 Análisis estadístico

La capacidad atrapadora de cada extracto de diente de ajo y de polvo de ajo para cada especie reactiva de oxígeno se analizó a partir de un programa de estadística (Graph Pad Prism versión 3.02, San Diego, CA) aplicando un ANOVA paramétrico seguido por comparaciones múltiples por el método de Dunnett. Los datos están expresados como promedio \pm error estándar de la media (EE). Una $p < 0.05$ se consideró significativa.

Para medir la capacidad de cada extracto para atrapar O_2^- , H_2O_2 o $\cdot OH$, se hizo el ensayo por cuadruplicado, se obtuvieron los porcentajes como se indicó anteriormente y se promediaron, de tal forma que al 100% se le restaron los promedios y se graficaron a partir de las concentraciones de cada extracto.

La actividad atrapadora se expresa como 50% de la concentración inhibitoria (IC_{50}) que es la concentración del extracto o compuesto (mg/mL) que se requiere para obtener el 50% del efecto inhibitorio. Entre menor sea el valor de la IC_{50} mayor es la capacidad del compuesto para atrapar O_2^- , H_2O_2 o $\cdot OH$. Los valores de IC_{50} se calcularon a partir de una recta ajustada por el método de mínimos cuadrados usando el programa Excel. Estos valores están expresados como promedio \pm intervalo de confianza al 95%.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Capacidad atrapadora de los extractos sobre el anión O_2^-

7.1.1 Extractos de ajo en polvo

En la figura X se muestra el efecto del extracto de ajo en polvo (panel A), el extracto de ajo en polvo calentado (panel B) y del NDGA (panel C) sobre la producción de ácido úrico y O_2^- . En el panel D se muestran los datos de los paneles A, B y C expresados como porcentaje de atrapamiento de O_2^- .

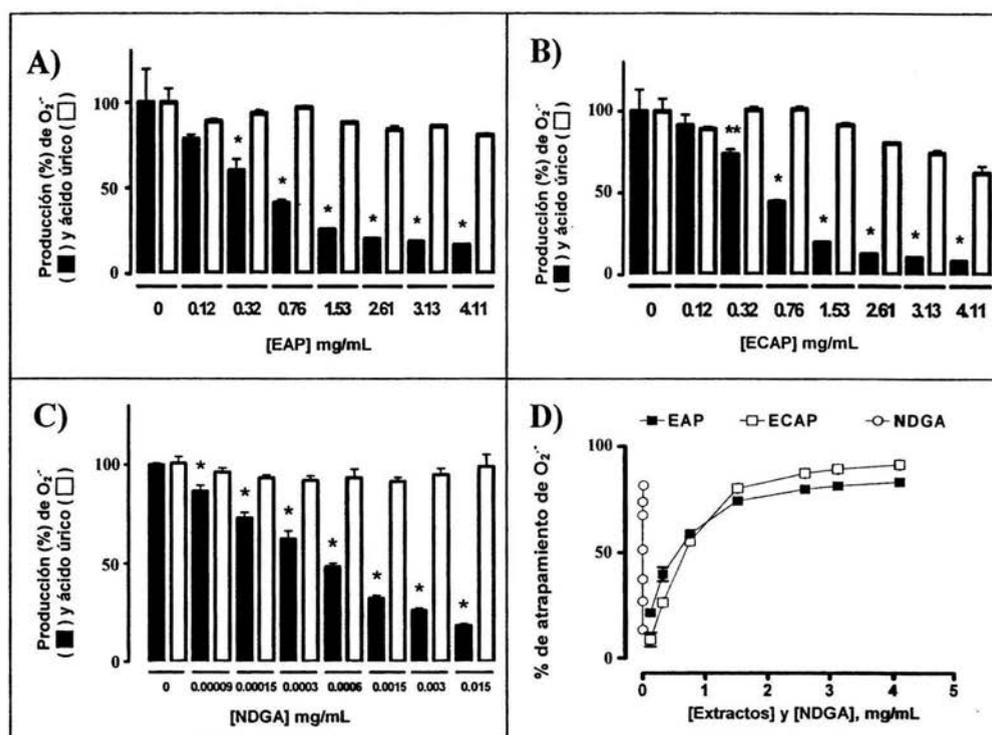


Figura X. Efecto del extracto de ajo en polvo (A), extracto calentado de ajo en polvo (B) y de ácido nordihidroguaiarético (C) sobre la generación del anión superóxido (O_2^-), determinando la producción de ácido úrico (□) y la reducción del NBT (■) en el sistema xantina/xantina oxidasa. El panel D muestra los porcentajes de atrapamiento de O_2^- de los dos extractos y del estándar utilizado (NDGA). Los datos están expresados como promedio \pm EE. $n = 4$. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ vs 0.

Las barras blancas indican la producción constante de ácido úrico, dato que indica que la capacidad antioxidante es directa, es decir, que los extractos están reaccionando con el O_2^- y no inhibiendo la xantina oxidasa. Las barras negras indican la inhibición de la formación del formazán mostrando una curva dosis-respuesta.

En el panel B se muestra que el calentamiento del extracto de ajo en polvo no afecta su capacidad para reducir al NBT indicando que dicho extracto mantiene su capacidad para atrapar al radical. También se observa que la capacidad antioxidante tanto del extracto de ajo en polvo como del ajo en polvo calentado es menor que la del estándar (D), al cual ya no fue posible incrementar las concentraciones en el sistema debido a que hubo interferencia óptica. La IC_{50} para el extracto de ajo en polvo fue de 0.51 mg/mL (panel A), mientras que para el extracto de ajo en polvo calentado fue de 0.66 mg/mL (panel B) (tabla 4) mostrando este último una menor actividad atrapadora. Esto sugiere que los compuestos clave en esta actividad pueden ser los dialil disulfuros, trialil disulfuros y los subsecuentes polisulfuros (Block, 1996) que son compuestos que se forman debido a la inestabilidad de la alicina, misma que se produce cuando el diente de ajo es cortado y calentado moderadamente a temperaturas menores a 100°C. El efecto

Tabla 4. Valores de IC_{50} de los extractos de diente de ajo y ajo en polvo

Estándares	IC_{50} (mg/mL)		
	O_2^-	H_2O_2	$\cdot OH$
Piruvato	-	0.41 ± 1.1	-
DMTU	-	-	0.007 ± 1.6
NDGA	0.0008 ± 1.4	-	-
Extractos			
EAP	0.51 ± 1.2	0.93 ± 1.2	-
ECAP	0.66 ± 1.1	1.41 ± 1.2	-
EDAC	3.35 ± 1.8	0.55 ± 1.2	-
ECDAC	1.82 ± 1.1	0.51 ± 1.0	-
ECDAAH	1.42 ± 1.1	0.50 ± 1.2	-
AD	-	1.80 ± 1.2	1.01 ± 1.1
AK	0.87 ± 1.0	0.73 ± 1.2	-
CK	-	4.59 ± 1.3	-

inhibitorio sobre la reducción del NBT o la producción del $O_2^{\cdot-}$ no puede explicarse por la inhibición de la xantina oxidasa, pues se observa que la producción del ácido úrico no se altera, con excepción de las últimas tres concentraciones del panel B.

7.1.2 Extractos de diente de ajo

En la figura XI se muestra el efecto de concentraciones crecientes del extracto de ajo crudo (A), del extracto calentado de ajo crudo (B) y del extracto de ajo hervido (C) sobre la producción de ácido úrico y $O_2^{\cdot-}$. En el panel D se muestran los datos de los paneles A, B y C expresados como porcentaje de atrapamiento de $O_2^{\cdot-}$.

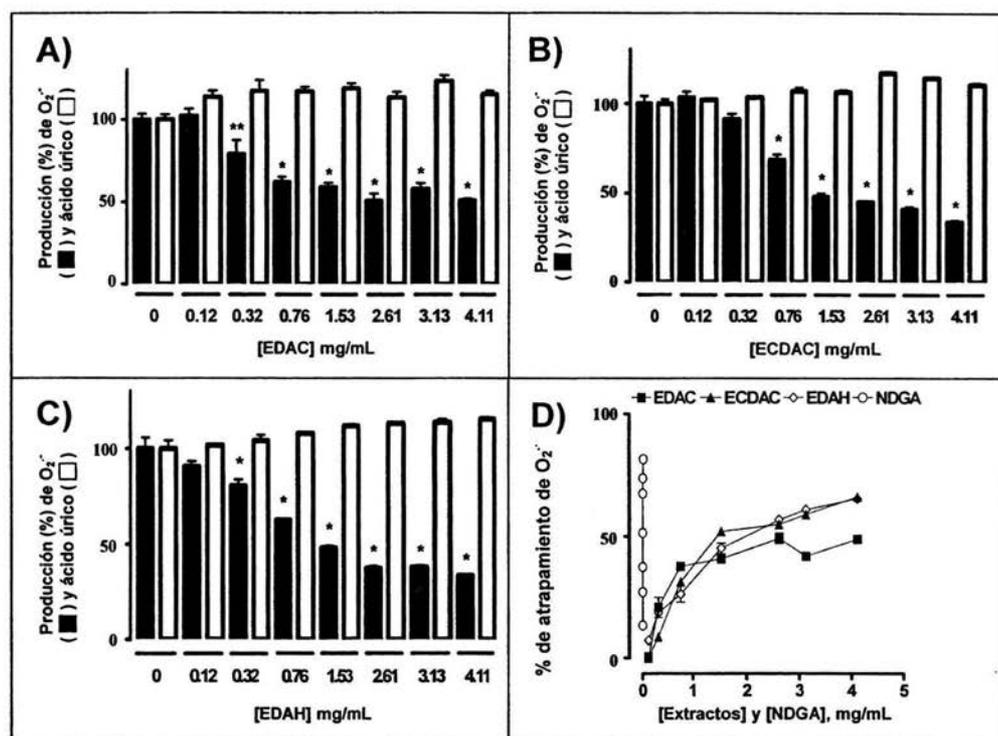


Figura XI. Efecto del extracto de ajo crudo (A), extracto calentado de ajo crudo (B), extracto de ajo hervido (C) sobre la generación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), determinando la producción de ácido úrico (□) y la reducción del NBT (■) en el sistema xantina/xantina oxidasa. El panel (D) muestra los porcentajes de atrapamiento de $O_2^{\cdot-}$ de los tres extractos y del estándar utilizado (NDGA). Los datos están expresados como promedio \pm EE. $n = 4$. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ vs 0.

La IC_{50} del extracto de ajo crudo fue de 3.35 mg/mL, la IC_{50} del extracto calentado de ajo crudo fue de 1.82 mg/mL y la IC_{50} del extracto de ajo hervido fue de 1.42 mg/mL. Esto nos dice que el calentamiento aumenta ligeramente la capacidad del diente de ajo para atrapar O_2 , sugiriendo que los compuestos presentes en el diente de ajo sin cortar tales como las sulfóxidos s-alkil-L- cisteína, entre los que se encuentra la alina y los γ -L- glutamil-S-alkil-L-cisteínas, tienen actividad para atrapar anión O_2 , sin embargo, dicha actividad es mayor comparándola con el extracto de ajo crudo, es decir, contra los compuestos que se forman cuando el ajo es cortado tales como alquilalcanotiosulfatos. Finalmente, el NDGA tiene mayor capacidad atrapadora de O_2 que todos los extractos estudiados, ya que su IC_{50} fue de 0.0008 mg/mL.

7.1.3 Extractos de ajo en polvo presente en cada forma farmacéutica

En la figura XII se muestra el efecto de concentraciones crecientes de extractos de ajo en polvo y ajo en polvo de las preparaciones comerciales: extracto de ajo en polvo (A), extracto de Ajo deshidratado (B), extracto de Arkocápsulas (C) y extracto de Cirkulin (D).

La reducción del NBT es muy evidente en la presentación comercial Cirkulin (panel D) si la comparamos con el extracto de ajo en polvo que no está bajo ninguna forma farmacéutica (panel A). Sin embargo, el extracto de polvo de ajo obtenido de Arkocápsulas muestra una IC_{50} de 0.87 mg/mL, mientras que el Ajo deshidratado como el Cirkulin no alcanza el 50% de atrapamiento.

Esta tendencia se puede observar en la figura XIII donde se comparan todos los extractos de ajo en polvo presente en cada preparación comercial como la del estándar. Estos resultados variables en la capacidad antioxidante del ajo en polvo presente en las formas farmacéuticas estudiadas ya se esperaban debido a que no se sabe el proceso de preparación del ajo en polvo, ni el origen que tenían los dientes de ajo utilizados para el proceso. También se puede atribuir a la muestra utilizada, ya que sólo fue una caja a la que se le determinó, para cada preparación comercial, actividad antioxidante.

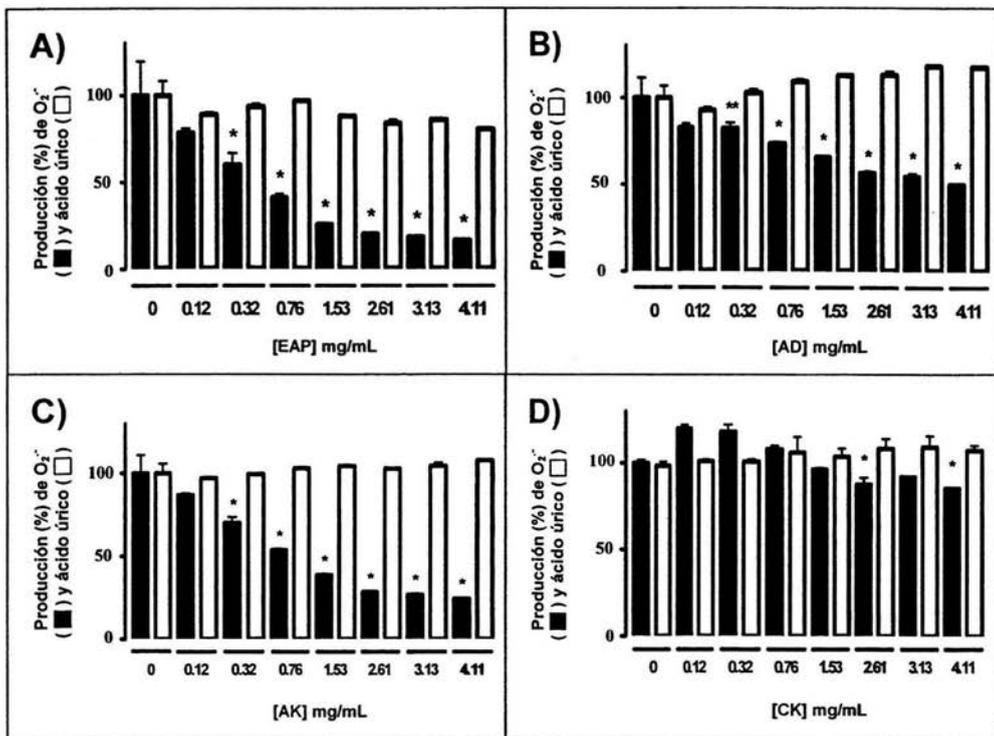


Figura XII. Efecto del extracto de ajo en polvo (A) y de los extractos de ajo en polvo contenido en cada forma farmacéutica: Ajo deshidratado (B), Arkocápsulas (C) y Cirkulin (D), sobre la generación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), determinando la producción de ácido úrico (□) y la reducción del NBT (■) en el sistema xantina/xantina oxidasa. Los datos están expresados como promedio \pm EE. $n = 4$. * $p < 0.05$.

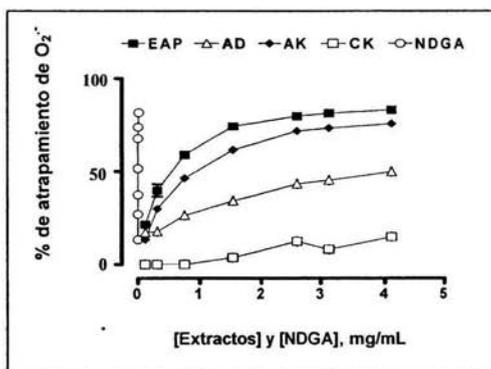


Figura XIII. Efecto de los diferentes extractos obtenidos del ajo en polvo presente en cada forma farmacéutica y del NDGA sobre el $O_2^{\cdot-}$ generado en el sistema xantina/xantina oxidasa. Los datos están expresados promedio \pm EE.

7.2 Capacidad atrapadora de los extractos sobre el H₂O₂

7.2.1 Extracto de ajo en polvo

En la figura XIV se presentan las curvas de dosis-respuesta de concentraciones de extractos de ajo en polvo (panel A) y ajo en polvo calentado (panel B) y de piruvato (panel C) sobre el porcentaje de H₂O₂ presente. El panel D muestra los datos de los paneles A, B, y C expresados como porcentaje de atrapamiento de H₂O₂. La IC₅₀ del extracto de ajo en polvo es de 0.93 mg/mL, mientras que para el ajo en polvo calentado es de 1.40 mg/mL (tabla 4). Esto sugiere que el calentamiento afecta los compuestos con actividad antioxidante presente en el polvo de ajo, disminuyendo la capacidad del mismo para atrapar H₂O₂.

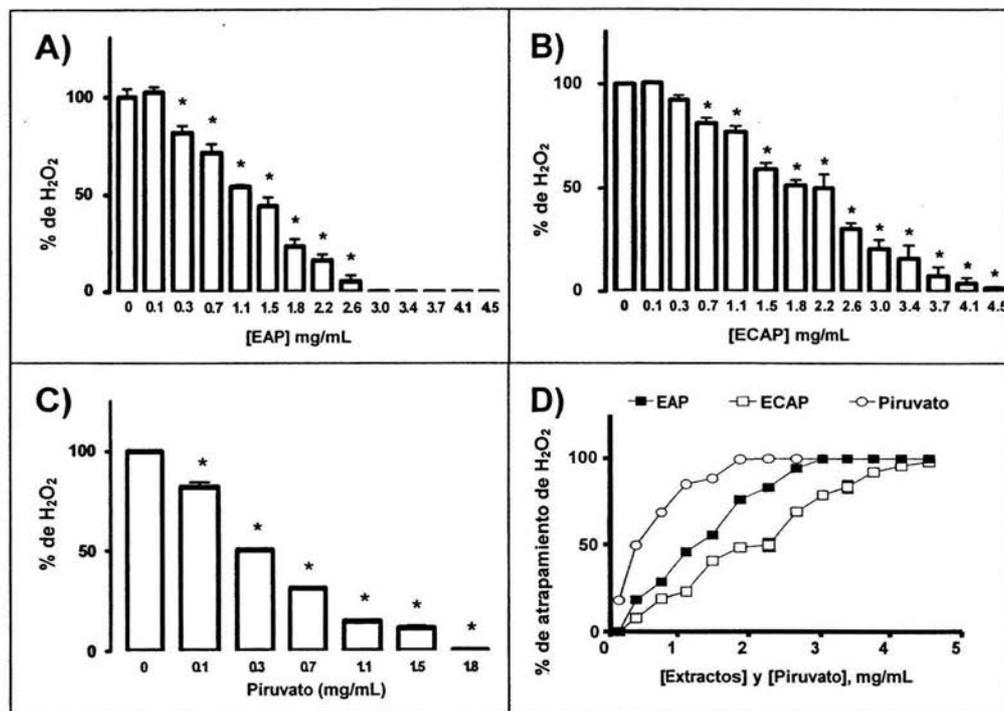


Figura XIV. Efecto del extracto de ajo en polvo (A), extracto calentado de ajo en polvo (B) y del piruvato (C) sobre la concentración de H₂O₂ en el ensayo hierro-naranja de xilenol. El panel D muestra los porcentajes de atrapamiento de H₂O₂ de los tres extractos y del estándar utilizado (Piruvato). Los datos están expresados como promedio \pm EE. n = 4. *p < 0.001 vs 0.

La capacidad del piruvato utilizado como estándar para atrapar H_2O_2 es mayor comparada con el extracto de ajo en polvo, ya que la IC_{50} se obtiene a una concentración de 0.41 mg/mL (C).

7.2.2 Extractos de diente de ajo

En la figura XV se muestra la capacidad antioxidante de los extractos de diente de ajo para neutralizar H_2O_2 . Al observar el panel (D) se puede ver que todos los extractos llegan a obtener un 100% de atrapamiento, sin embargo, el extracto de ajo hervido tiene una IC_{50} de 0.50 mg/mL, mientras que el extracto calentado de ajo crudo tiene una IC_{50} de 0.51 mg/mL.

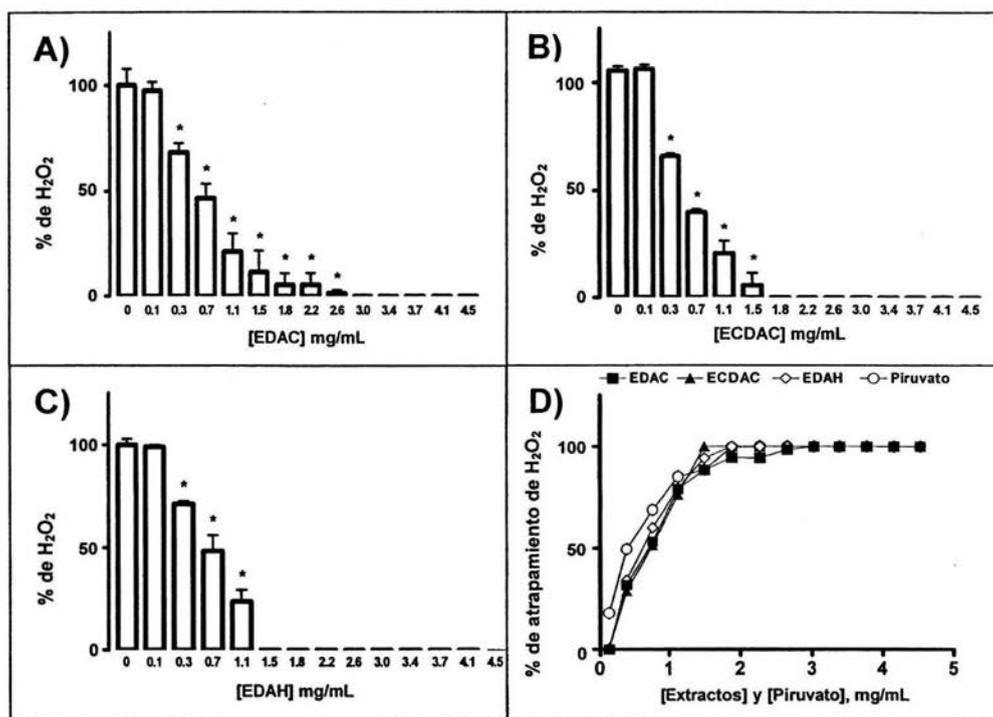


Figura XV. Efecto del extracto de ajo crudo (A), extracto calentado de ajo crudo (B), extracto de ajo hervido (C) sobre la concentración de H_2O_2 en el ensayo hierro-naranja de xilenol. El panel D muestra los porcentajes de atrapamiento de H_2O_2 de los tres extractos y del estándar utilizado (Piruvato). Los datos están expresados como promedio \pm EE. $n = 4$. * $p < 0.001$.

Si comparamos las IC_{50} del extracto calentado de ajo crudo (0.51 mg/mL) y del extracto de ajo hervido (0.50 mg/mL) con la IC_{50} del extracto de ajo crudo que fue de 0.55 mg/mL, deducimos que el calentamiento no disminuye la actividad antioxidante. Con ello, los tiosulfatos presentes en el extracto calentado de ajo crudo son estables a la temperatura de ebullición del agua, sugiriendo que el ajo mantiene su capacidad antioxidante. La alina compuesto presente en el extracto de diente de ajo hervido como la S-alilcisteína y S-l-propenilcisteína producidos a causa de la hidrólisis de la γ -glutamilcisteína tienen capacidad de atrapar H_2O_2 (Koch y Lawson, 1996). Además, si comparamos las IC_{50} de los extractos con la del estándar de piruvato nos damos cuenta que esta capacidad antioxidante para H_2O_2 es muy alta, similar a la del piruvato donde la IC_{50} fue de 0.41 mg/mL.

7.2.3 Extracto de ajo en polvo en formas farmacéuticas

En los paneles de la figura XVI se observa una curva dosis-respuesta donde al aumentar la concentración de cada extracto aumenta la capacidad neutralizante o atrapadora para H_2O_2 . Con excepción de la concentración de 0.1 mg/mL en todos los paneles, de 0.3 mg/ml en los paneles B y D y de 0.7 mg/mL en el panel D, las concentraciones utilizadas son diferentes significativamente. La capacidad del estándar para atrapar H_2O_2 es mayor que la de los extractos mencionados. Esto puede observarse en la figura XVII donde los datos de la figura XVI están expresados como porcentaje de atrapamiento de H_2O_2 . En la tabla 4 se muestra los valores de IC_{50} de cada extracto: 1.8 mg/mL para el Ajo deshidratado, 0.73 mg/mL para Arkocápsulas y 4.59 mg/mL para Cirkulin.

Por tanto, la capacidad antioxidante se muestra en el siguiente orden: Arkocápsulas > Polvo de ajo > Ajo deshidratado > Cirkulin.

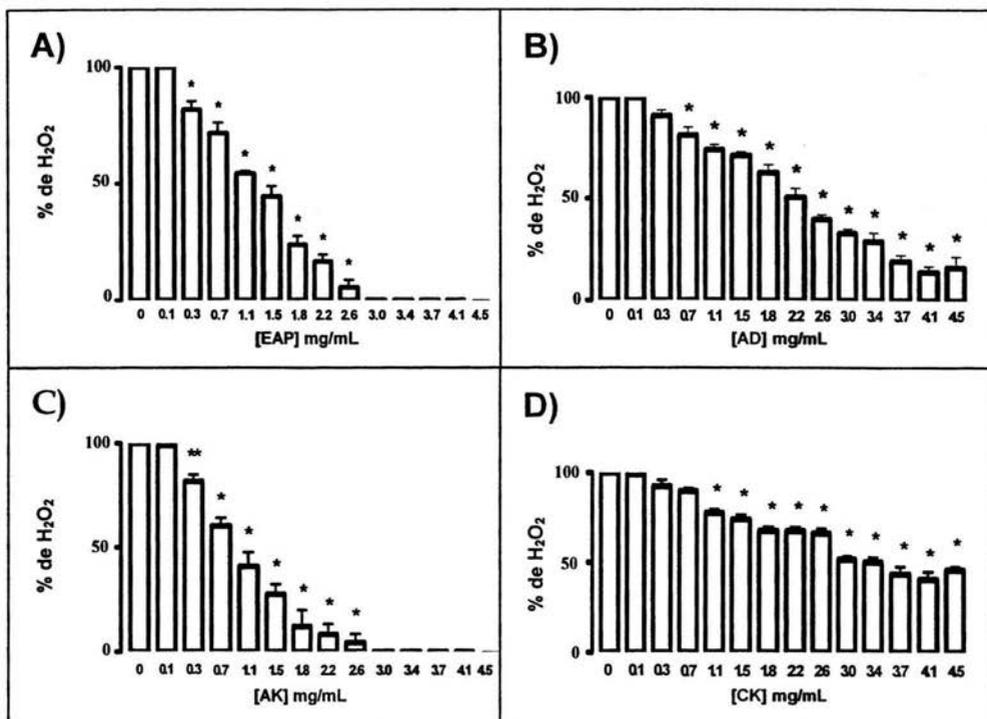


Figura XVI. Efecto del extracto de ajo en polvo (A) y de los extractos de ajo en polvo contenido en cada forma farmacéutica: Ajo deshidratado (B), Arkocápsulas (C) y Cirkulin (D) sobre la concentración de H₂O₂ en el ensayo hierro-naranja de xilenol. Los datos están expresados como promedio \pm EE. $n = 4$. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ vs 0.

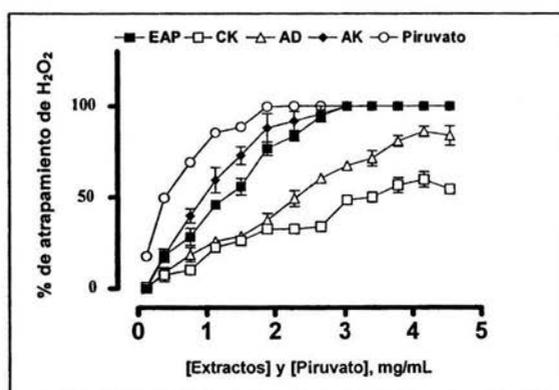


Figura XVII. Efecto de los diferentes extractos obtenidos del ajo en polvo presente en cada forma farmacéutica y del piruvato sobre el H₂O₂ presente en el ensayo hierro-naranja de xilenol. Los datos están expresados como promedio \pm EE.

7.3 Capacidad atrapadora de los extractos sobre el $\cdot\text{OH}$

7.3.1 Extractos de ajo en polvo

La figura XVIII se muestra el efecto del extracto de ajo en polvo (panel A), extracto de ajo en polvo calentado (panel B) y dimetiltiourea (panel C) sobre la producción de $\cdot\text{OH}$. El panel D muestra los datos de los paneles anteriores expresados como porcentaje de atrapamiento del radical. En el panel B se muestra que el efecto del calentamiento para el polvo de ajo no afecta su capacidad antioxidante para radical $\cdot\text{OH}$; esta preparación conserva su capacidad para atrapar radical $\cdot\text{OH}$ ($p < 0.001$ vs 0).

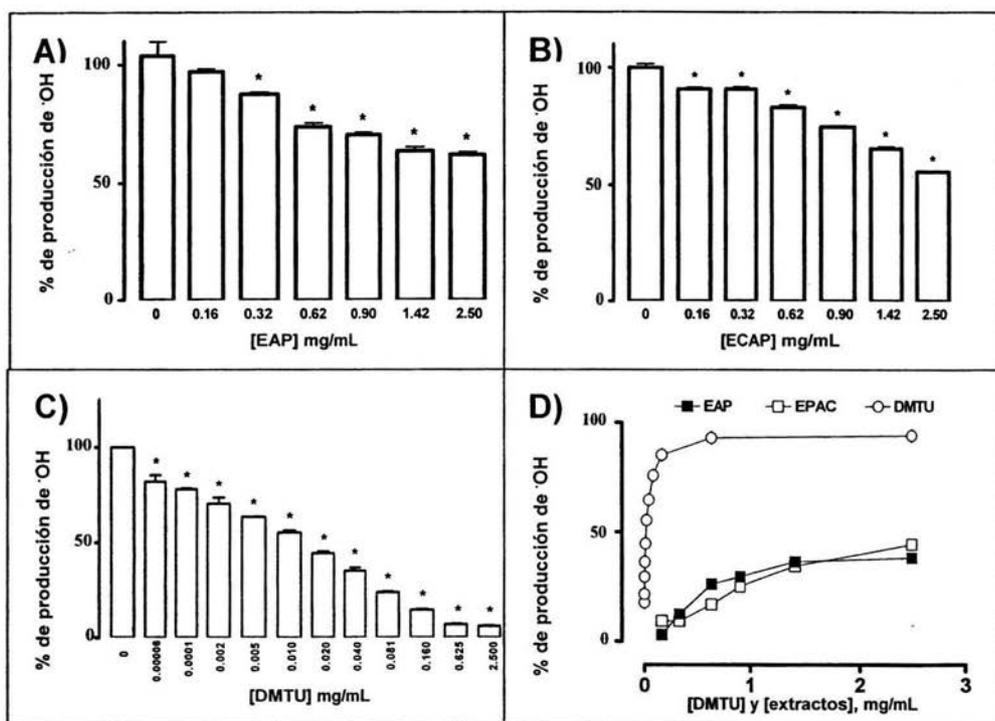


Figura XVIII. Efecto del extracto de ajo en polvo (A), extracto calentado de ajo en polvo (B) y de dimetiltiourea (C) sobre la producción de radical $\cdot\text{OH}$. Los datos están expresados como promedio \pm EE. $n = 4$. $*p < 0.001$.

Sin embargo, en la primera concentración del extracto de ajo en polvo del panel A no es significativa con respecto a la primera barra (0 mg/mL). La capacidad antioxidante de los extractos para $\cdot\text{OH}$ es menor comparada con el estándar de DMTU, ya que ninguno de los dos extractos alcanza un 50% de atrapamiento, es decir, no tiene IC_{50} . Sin embargo, la IC_{50} de la DMTU es de 0.007 mg/mL.

7.3.2 Extracto de diente de ajo

En los paneles A, B y C de la figura XIX se muestran los resultados obtenidos a 532 nm, expresados como porcentaje de producción de $\cdot\text{OH}$, en los cuales se observa una

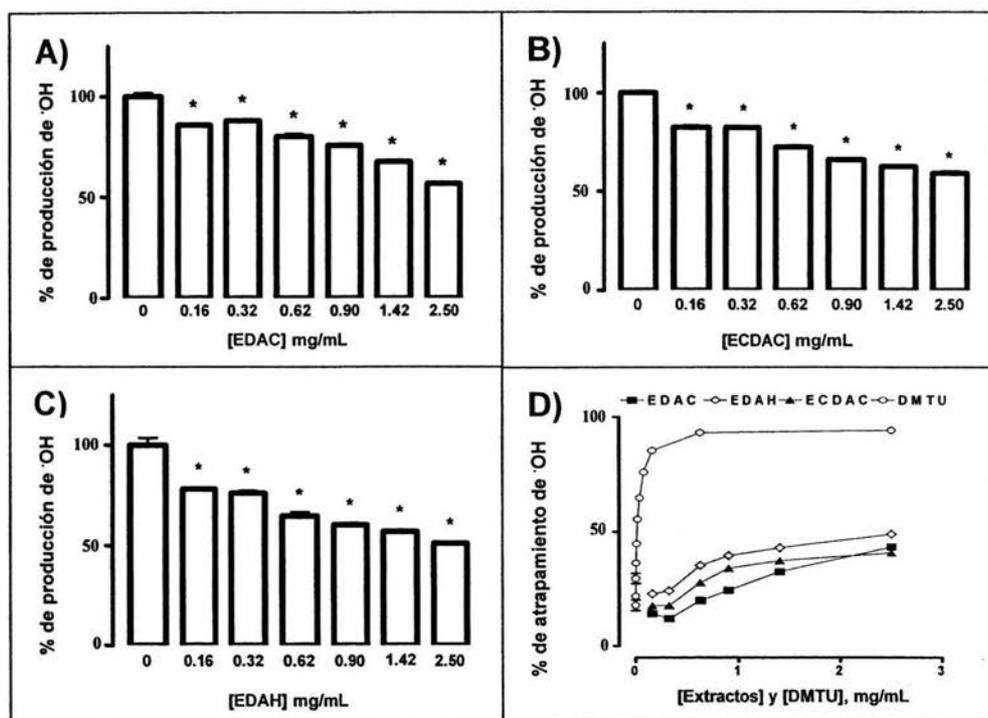


Figura XIX Efecto del extracto de ajo crudo (A), extracto calentado de ajo crudo (B), extracto de ajo hervido (C) sobre la producción de radical $\cdot\text{OH}$. El panel (D) muestra los porcentajes de atrapamiento de $\cdot\text{OH}$ de los tres extractos y del estándar utilizado (DMTU). Los datos están expresados como promedio \pm EE. $n = 4$. * $p < 0.001$.

curva dosis-respuesta, en donde al aumentar la concentración de los extractos aumenta la capacidad atrapadora de $\cdot\text{OH}$, siendo cada concentración utilizada significativamente diferente con respecto al control.

Con esto podemos decir que el efecto del calentamiento del diente de ajo ya sea antes o después de cortarlo no afecta la capacidad atrapadora de radicales OH . Al comparar los extractos con el estándar de DMTU (panel D) notamos que los extractos no alcanzan a obtener el 50% de atrapamiento, siendo menor a la actividad de DMTU.

7.3.3 Extractos de ajo en polvo en formas farmacéuticas

En los paneles A y B de la figura XX se muestra una curva dosis-respuesta, donde al aumentar la concentración del extracto aumenta también la capacidad atrapadora de

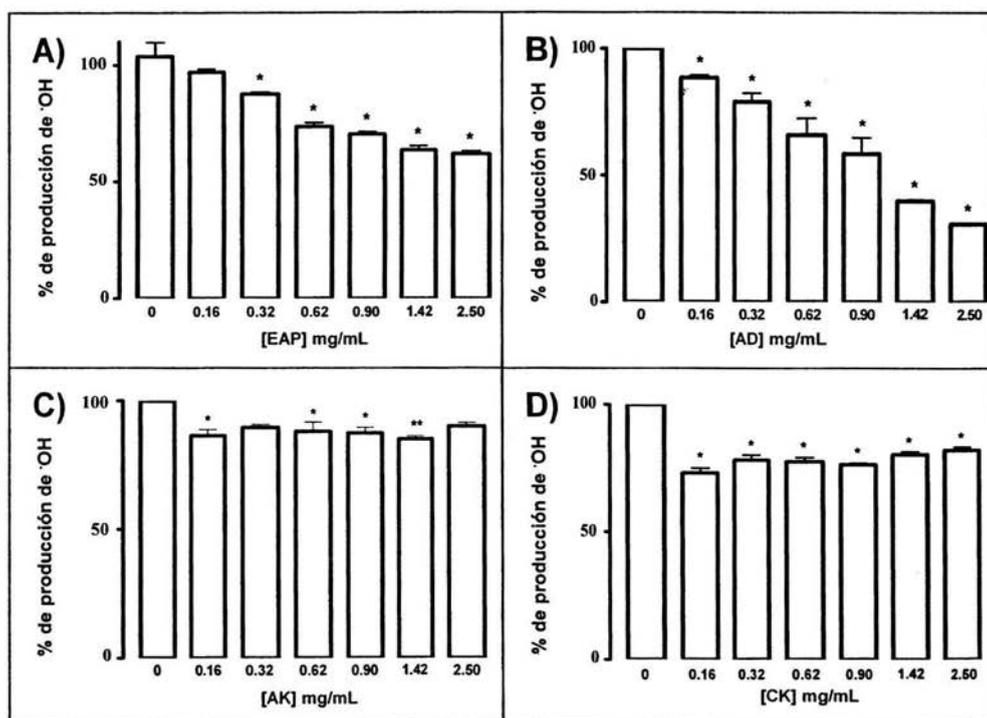


Figura XX. Efecto del extracto de ajo en polvo (A) y de los extractos de ajo en polvo contenido en cada forma farmacéutica: Ajo deshidratado (B), Arkocápsulas (C) y Cirkulin (D) sobre la producción de radical $\cdot\text{OH}$. Los datos están expresados como promedio \pm EE. $n = 4$. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ vs 0.

OH. Las concentraciones utilizadas fueron significativamente diferentes ($p < 0.001$) con respecto a la primera barra (0 mg/mL) de cada panel, excepto para la concentración de 0.16 mg/mL del panel A.

En los paneles C y D de la figura XX se observa actividad atrapadora, sin embargo, la curva dosis-respuesta no es observable tanto en Arkocápsulas como con Cirkulin.

En la figura XXI se muestran los datos de los paneles de la figura XX expresando los resultados como porcentaje de atrapamiento de radical $\cdot\text{OH}$, donde se puede apreciar que los extractos tienen menor capacidad atrapadora de $\cdot\text{OH}$ comparada con el estándar. Además, la única presentación comercial que alcanza la IC_{50} es el Ajo deshidratado con 1.01 mg/mL, sin embargo, es menor comparada con el estándar el cual fue de 0.007 mg/mL.

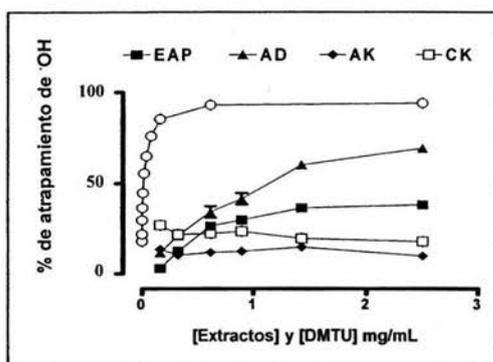


Figura XXI. Efecto de los diferentes extractos de ajo en polvo presente en cada forma farmacéutica y de DMTU sobre la producción del $\cdot\text{OH}$. Los datos están expresados como promedio \pm EE.

Finalmente, se puede decir que el calentamiento a ebullición por 30 minutos no afecta la capacidad de estos extractos de diente de ajo (antes y después de cortar) y de ajo en polvo para atrapar O_2^- , H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$, sugiriendo que los constituyentes sulfurados del diente de ajo intacto como la alina, tiene actividad antioxidante, dada su existencia por la inactivación de la alinasa.

Se puede agregar también que el efecto protector que tiene ante ciertas enfermedades probablemente se debe a que neutraliza ERO como O_2^- , H_2O_2 y $\cdot OH$. Razón que podría ser investigada en los efectos benéficos de la alicina como inductora de apoptosis en células cancerígenas (Oommen et al., 2004), además del efecto reductor de la presión arterial, insulina y triglicéridos (Elkayam et al., 2001) y de los compuestos formados cuando la alicina es oxidada o hidrolizada como consecuencia del calentamiento como los dialildisulfuro, dialiltrisulfuro y los correspondientes polisulfuros (Block, 1996), efectos protectores en la lipoperoxidación, la actividad bactericida y bacteriostática contra *Helicobacter pylori* (Awazu y Horie, 1997; Cellini et al., 1996; Ide y Lau, 2001), y su efecto atrapador de $\cdot OH$ (Prasad et al., 1996), etc., donde tanto la alicina como la alicina están involucradas.

La inconsistencia en la actividad antioxidante del polvo de ajo presente en las formas farmacéuticas puede deberse al tratamiento que recibe el diente de ajo para preparar el ajo en polvo (Block, 1996).

8. CONCLUSIONES

- La actividad antioxidante del ajo está presente, aún cuando la alinasa es inhibida al calentar por 30 minutos el diente de ajo (antes de cortar), sugiriendo que los compuestos presentes antes y después de la activación de la alinasa tienen capacidad antioxidante.
- Los compuestos con actividad antioxidante son estables a la temperatura de ebullición del extracto de diente de ajo y de ajo en polvo por 30 minutos.
- La actividad antioxidante de las presentaciones comerciales no es uniforme.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar si los extractos utilizados de diente de ajo y ajo en polvo tienen capacidad de atrapar otras especies reactivas de oxígeno: singulete, ácido hipocloroso, peroxinitrito, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) y otros radicales cuando son sometidos a calentamiento por 30 minutos.

10. Referencias

- Albarrán-Morán AG. 2003. Efecto de dos extractos acuosos del ajo sobre la oxidación de lipoproteínas de baja densidad en el suero humano. Tesis de licenciatura, Química de alimentos. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Pág. 27, 46.
- Ali M, Bordia T, Mustafa T. 1999. Effect of raw versus boiled aqueous extract of garlic and anion on platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60:43-47.
- Ali M. 1995. Mechanism by which garlic (*Allium sativum*) inhibits cyclooxygenase activity. Effect of raw versus boiled garlic extract on the synthesis of prostanoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 53:397-400.
- Awazu S, Horie T. 1997. "Antioxidants in garlic. II. Protection of heart mitochondria by garlic extract and diallyl polysulfide from the doxorubicin-induced lipid peroxidation" Ch. 14. En *Nutraceuticals: Designer foods III garlic, Soy and Licorice*. Lanchance PP, Ed. Food & Nutrition Press, Trumbel, pp 131-138.
- Banerjee SK, Maulik M, Mancahanda SC, Dinda AK, Gupta SK, Maulik SK. 2002. Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life Sci* 70:1509-1518.
- Block E. 1996 "The chemistry and health benefits of organosulfur and organoselenium compounds in garlic (*Allium sativum*): Recent findings", En: *Hypernutritious foods*, JW Finley, DJ Armstrong, S Nagy, SF Robinson, Eds., AgSci Inc., Auburnvale, FL, pp 261-292.
- Bordia T, Mohammed M, Thomson M, Ali M. 1996. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54:183-186.
- Brace LD. 2002. Cardiovascular benefits of garlic (*Allium sativum* L). *J Cardiovasc Nurs* 16:33-49.
- Castro-Cardelas L. 2003. Efecto de S-alilmercaptocisteína sobre el sistema antioxidante enzimático en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina. Tesis de licenciatura, Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Pág. 39.

- Cellini L, Campi ED, Masulli M, Bartolomeo SD, Allocati N. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). FEMS Immunol Med Microbiol 13:273-277.
- Cerón-Toalá AC. 2002. Efecto protector del dialil sulfuro sobre la nefrotoxicidad inducida por gentamicina. Tesis de licenciatura, Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Pág. 52.
- Chávez A, Ledesma A. 1997. Tabla de recomendaciones y valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica. En Composición de alimentos industrializados. Tabla de uso práctica. Bourges RH, Ed. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México.
- Chirino-López YI. 2003. Efecto de la S-alilmercaptocisteína en un modelo de daño renal inducido por gentamicina. Tesis de licenciatura, Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Pág. 45.
- Cohen-Kerem R, Koren G. 2003. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity. I. Review of the experimental data and implications to humans. Neurotoxicol Teratol 25:1-9.
- Dwivedi C, John LM, Schmidt DS, Engineer FN. 1998. Effects of oil-soluble organosulfur compounds from garlic on doxorubicin-induced lipid peroxidation. Anticancer Drugs 9:291-294.
- Elkayam A, Mirelma D, Peleg E, Wilchek M, Miran T, Rabinkov A, Sadetzki S, Rosenthal T. 2001. The effects of allicin and enalapril in fructose-induced hyperinsulinemic hyperlipidemic hypertensive rats. Am J Hypertens 14:377-381.
- Fanelli SL, Castro GD, de Toranzo EG, Castro JA. 1998. Mechanisms of the preventive properties of some garlic components in the carbon tetrachloride-promoted oxidative stress. Diallyl sulfide; diallyl disulfide; allyl mercaptan and allyl methyl sulfide. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 102:163-174.
- Fukagawa NK. 1999. Aging: is oxidative stress a marker or is it causal? Proc Soc Exp Biol Med 222:293-297.

- Geng Z, Rong Y, Lau BH. 1997. S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* 23:345-350.
- Gil-Ortiz M. 2004. Efecto de diferentes extractos de ajo sobre la oxidación de lipoproteínas de baja densidad en suero humano. Tesis de licenciatura, Química de alimentos. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Pág. 50, 17-18.
- González-Orozco AE. 2003. El dialil disulfuro atenúa el daño renal y el estrés oxidativo inducido por gentamicina en ratas. Tesis de licenciatura, Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Pág. 40.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. Oxford University Press.
- Hikino H, Tohkin M, Kiso Y, Namiki T, Nishimura S, Takeyama K. 1986. Antihepatotoxic actions of *Allium sativum* bulbs. *Planta Med* 3:163-168.
- Ho SE, Ide N, Lau BH. 2001. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 8:39-46.
- Horie T, Awazu S, Itakura Y, Fuwa T. 1992. Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med* 58:468-469.
- Huang CN, Horng JS, Yin MC. 2004. Antioxidative and antiglycative effects of six organosulfur compounds in low-density lipoprotein and plasma. *J Agric Food Chem* 52:3674-3678.
- Ide N, Lau BH. 1999. Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine* 6:125-131.
- Ide N, Lau BH. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kB activation. *J Nutr* 131:1020S-1026S.
- Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 1996. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 10:340-341.
- Ide N, Nelson AB, Lau BH. 1997. Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu(2+)-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med* 63:263-264.

- Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 60:417-420.
- Imlay JA. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57:395-418.
- Kanehira T, Takekoshi S, Nagata H, Matsuzaki K, Kambayashi Y, Osamura RY, Homma T. 2003. A novel and potent biological antioxidant, Kinobeaon A, from cell culture of safflower. *Life Sci* 74:87-97.
- Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Know YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM. 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med* 30: 747-756.
- Koch HP, Lawson LD. 1996. Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species; Williams & Wilkins: Baltimore.
- Kourounakis PN, Reka EA. 1991. Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 74:249-252.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 59:612-619.
- Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorr RT. 2002. Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 40:1701-1708.
- Lawson LD. 1998. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. En: *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. Lawson LD, Bauer R. Washington DC: American Chemical Society; 176-209. ACS Symposium series 691.
- Leiva LE, Del Pozo HA, Pérez D. 2000. Óxido nítrico y su relación con la hipertensión arterial. *Rev Cub Med* 39:174-179.
- Maldonado-Jiménez PD. 2004. La S-alilcisteína y el extracto de ajo envejecido atenúan la nefropatía y el estrés oxidativo inducidos por gentamicina en ratas. Tesis de doctorado. Facultad de Química, UNAM. México D.F. Pág. 76.

- Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 2003a. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* 73:2543-2556.
- Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina O, Hernández R, Pedraza-Chaverri J. 2003b. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 35:317-324.
- Maritim A, Sanders R, Watkins J. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* 17:24-36.
- Masnatta L, Fischer P, Dominguez G, Cabrera E, Ramírez A, Sánchez R. 2003. Marcadores de estrés oxidativo. Su valor en la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular en el hospital de día. *Rev Fed Arg Cardiol* 32:177-183.
- Oommen S, Anto RJ, Srinivas G, Karunagaran. 2004. Allicin (from garlic) induces caspasa-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur J Pharmacol* 85:97-103.
- Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 2000a. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 29:602-611.
- Pedraza-Chaverri J, Medina O, Granados MA, Maldonado P, Olivares IM, Hernández R. 2000b. Garlic ameliorates hyperlipidemia in chronic aminonucleoside nephrosis. *Mol Cell Biochem* 211:67-77.
- Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Medina O, Granados M, Franco M. 1998. Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 62:PL71-PL77.
- Pedraza-Chaverri J, Gil-Ortiz M, Albarran G, Barbachano-Esparza L, Menjivar M, Medina-Campos ON. 2004a. Garlic's ability to prevent in vitro Cu²⁺-induced lipoprotein oxidation in human serum is preserved in heated garlic: effect unrelated to Cu²⁺-chelation. *Nutr J* 3:10
- Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macias-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernandez-Pando R. 2004b S-

allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clin Pharmacol* 4:5.

- Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Barrera D, Ceron A, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R. 2003a. Protective effect of diallyl sulfide on oxidative stress and nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Mol Cell Biochem* 254:125-130.
- Pedraza-Chaverri J, Gonzalez-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R. 2003b Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 473:71-78.
- Pérez-García V. 2002. Efecto del dialil trisulfuro en la insuficiencia renal aguda experimental. Tesis de licenciatura, Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Pág. 42.
- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. 1995. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* 148:183-189.
- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. 1996. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Mol Cell Biochem* 54:55-63.
- Reckelhoff JF, Romero JC. 2003. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R893-R912.
- Ryu K, Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 2001. N α -(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-arginine, an antioxidant compound identified in aged garlic extract. *J Nutr* 13:972S-976S.
- Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. 1991. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 88:1886-1893.
- Sener G, Satioglu H, Sehirlı A, Kacmaz A. 2003. Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Life Sci* 73: 81-91.
- Siegers CP, Röbbke A, Pentz R. 1999. Effects of garlic preparations on superoxide production by phorbol ester activated granulocytes. *Phytomedicine* 6:13-16.

- Song K, Milner JA. 2001. The influence of heating on the anticancer properties of garlic. *J Nutr* 131:1054S-1057S.
- Torok B, Belagyi J, Rietz B, Jacob R. 1994. Effectiveness of garlic on the radical activity in radical generating systems. *Arzneimittelforschung* 44:608-611.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237:408-414.
- Turrens JF, Boveris A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191:421-427.
- Ueda N, Mayeux P, Baliga R, Shah S. 2001. Oxidant mechanisms in acute renal failure. En: *Acute renal failure*. Molitoris BM, Finn WF. (Eds). W.B. Saunders Company. pp 60-77.
- Walker PD, Shah SV. 1988. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 81:334-341.
- Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. 1998. Protective effects of aged garlic extract against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 126:213-222.
- Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. 1999. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 132:215-225.
- Xiao H, Parkin KL. 2002. Antioxidant functions of selected allium thiosulfinates and S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides. *J Agric Food Chem* 50:2488-2493.
- Yamasaki T, Li L, Lau BH. 1994. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother Res* 8:408-412.
- Yang GC, Yasaei MP, Page SW, 1993. Garlic as antioxidant and free radical scavenger. *J Food Drug Anal* 1:357-364.
- Yin MC, Cheng WS. 1998. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *J Food Prot* 61:123-125.